

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Untersuchungen zur Genregulation durch den Tumormarker CD133



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sabrina Ott
aus Landsberg am Lech
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Oliver J. Stoetzer
Prof. Dr. Vigo Heissmeyer
Dekan: Prof. Dr. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2017

Für meinen Papa

Eidesstattliche Versicherung

Ott, Sabrina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchungen zur Genregulation durch den Tumormarker CD133“

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.05.2016

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Untersuchungen zur Genregulation durch den Tumormarker CD133.....	I
Eidesstattliche Versicherung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XII
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	2
1.1 Krebs.....	2
1.1.1 Karzinogenese	3
1.1.2 Theorien der Krebsentstehung	4
1.1.3 Tumor initiating cells (TICs) und tumorassoziierte Antigene	6
1.1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Krebsprogression	7
1.2 CD133 (Cluster of differentiation 133).....	9
1.2.1 Das CD133 Gen und seine Regulation	10
1.2.2 Die Struktur des CD133 Proteins	13
1.2.3 Lokalisation, Splicevarianten, Proteinisoformen und posttranslationale Modifikation von CD133	15
1.2.4 Die Funktion von CD133	18
1.2.5 Pathologien durch den Verlust der CD133 Funktion	22
1.2.6 Das Expressionsmuster von CD133 in verschiedenen Zellentitäten.....	23
1.2.7 Funktionelle Untersuchungen von CD133 in Xenograft- Modellen	28
1.2.8 Die Bedeutung von CD133 als prognostischer und therapeutischer Marker	29
1.3 Zielsetzung	31
2 Material	32
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	32
2.1.1 Chemikalien und Kits.....	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3 Geräte	35
2.1.4 Dienstleistungen.....	36
2.2 Puffer und Stammlösungen.....	36
2.2.1 Zellkultur	36

2.2.2	Durchflusszytometrie	37
2.2.3	Western Blot	37
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	38
2.3	Antikörper	38
2.4	Oligonukleotide	39
2.4.1	Primer	39
2.4.2	siRNA	40
2.4.3	shRNA	40
2.5	Plasmide	41
2.6	Zelllinien	41
3	Methoden	43
3.1	Zellkultur	43
3.1.1	Zellkulturbedingungen	43
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	44
3.1.4	Transfektion und Selektion verschiedener Zelllinien	45
3.1.5	Generierung von Zelllysaten	46
3.2	Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	46
3.3	TGF β Assay	47
3.4	Colony Formation Assay	47
3.5	Sphäroid Modell	48
3.5.1	Bildung von Sphäroiden	48
3.5.2	Invasion von Fibroblasten-Sphäroiden	48
3.6	Molekularbiologische Methoden	49
3.6.1	Isolation von RNA und Synthese von cDNA	49
3.6.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	50
3.6.3	Standard Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	50
3.6.4	Agarose Gelelektrophorese	51
3.6.5	Real time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT- PCR)	51
3.7	Western Blot	52
3.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.7.2	SDS-Polyacrylamidgele	53
3.7.3	Western Blot	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Expression von CD133 auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien	55
4.1.1	Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie CaCo-2 csi/siRNA transfiziert	55
4.1.2	Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert	57

4.1.3	Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie HEK293 CD133 ^{-/+} angereichert	58
4.2	Die Auswirkung der CD133-Expression auf die Genregulation ...	59
4.2.1	Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mittels RT-PCR.....	60
4.2.2	Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mittels qRT-PCR.....	71
4.3	Auswirkung von Zellstress auf Zelllinien <i>in vitro</i>	76
4.3.1	Auswirkung von Hypoxie (0,1% O ₂) auf Zelllinien <i>in vitro</i>	76
4.3.2	Die Auswirkung von Nährstoffentzug (1%FCS) auf verschiedene Zelllinien <i>in vitro</i>	85
4.4	Einfluss von TGFβ auf die Zelldifferenzierung	90
4.4.1	Proliferation und Zellmorphologie durch Zugabe von TGFβ	90
4.4.2	Durchflusszytometrisch gemessene Expression von CD133 durch Zugabe von TGFβ	92
4.4.3	Veränderungen von CD133 auf RNA-Ebene durch Zugabe von TGFβ	92
4.5	<i>In-vitro</i> verankerungsunabhängiges Wachstum mit Kolonienbildung.....	94
4.5.1	<i>In vitro</i> verankerungsunabhängiges Wachstum der Zelllinie HEK293 CD133 ^{-/+} angereichert	95
4.5.2	<i>In vitro</i> verankerungsunabhängiges Wachstum der Zelllinie MDA-MB468.....	97
4.6	<i>In-vitro</i> Gewebeinvasion im Sphäroid-Modell.....	98
4.6.1	Bildung von Kolonien bei HEK293 CD133 ^{-/+} angereicherten Zellen.....	98
4.6.2	Invasion eines Fibroblastenzellverbundes durch HEK293 CD133 ^{-/+} angereichert	99
5	Diskussion.....	101
5.1	CD133-Expression in verschiedenen Zelllinien.....	103
5.2	Regulation ausgewählter Gene bei veränderter CD133-Expression	105
5.3	Die Auswirkung von Zellstress auf die verschiedenen Zelllinien	110
5.3.1	Die Auswirkung von Hypoxie auf Proliferation, Morphologie und CD133-Expression	110
5.3.2	Die Auswirkung von Nährstoffentzug auf Proliferation, Morphologie und CD133-Expression	113
5.4	Veränderung der CD133-Expression durch Einleitung der EMT	114
5.5	Verankerungsunabhängiges Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien <i>in vitro</i>	115
5.6	Gewebeinvasion durch HEK293 CD133 ^{-/+} Zellen <i>in vitro</i>	116

5.7	Ausblick.....	117
6	Zusammenfassung	121
7	Literaturverzeichnis.....	123
8	Danksagung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APP	Amyloid β precursor protein
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BACE2	Beta-site APP-cleaving enzyme 2
BAI3	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3
bp	Basenpaare
BRCA	Brustkrebsgen (BReast CAncer early onset)
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
BW	backward
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CD133	Cluster of Differentiation 133 (Trivialname: Prominin 1)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2
CNN2	Calponin 2
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
csi	Kontroll siRNA
d.h.	das heißt
DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUSP5	Dual specificity phosphatase 5
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FERMT1	Fermitin family homolog 1 (Drosophila)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FW	forward
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA2	GATA binding protein 2
GD3	Gangliosid D3
GM1	Gangliosid M1
H. pylori	Helicobacter pylori
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	humanes Papillomavirus
HRE	hypoxia response element
Kat.Nr.	Katalognummer
KCl	Kaliumchlorid
kDa	KiloDalton
KLF11	Kruppel-like factor 11
l	Liter
M	Molar
m	milli
mA	Milliampere
max.	maximal
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
MHCI	major histocompatibility complex I
min	Minute
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n.a.	nicht angegeben
NaCl	Natriumchlorid
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	PBS + Tween-20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
RBP7	retinol binding protein 7, zellulär

RNA	Ribonukleinsäure
RPL13a	ribosomales Protein L13a
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Realtime Polymerase Kettenreaktion
RUNX3	runt-related transcription factor 3
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHISA2	shisa family member 2
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SV	Splicevariante
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TF	tissue factor
TGFβ	transforming growth factor β
TIC	tumor initiating cell
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Triton X-100	Polyethylene Glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl Ether
Tween 20	Polyoxyethylen-20-Sorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation
ZNF420	zinc finger protein 420
ZNF91	zinc finger protein 91
μl	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: CD133 Identifikation in murinem, adultem, gesundem Gewebe. ...	23
Tabelle 1.2: Detektion von CD133 mRNA und AC133-Epitop in humanem, adultem, gesunden Gewebe	24
Tabelle 1.3: CD133 Identifikation in humanen soliden Tumoren.....	27
Tabelle 1.4: Übersicht der verschiedenen Tumoren mit einer schlechteren Prognose bei CD133-Expression mit Angabe der Referenzen.....	29
Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Kits.....	32
Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 2.3: Verwendete Geräte	35
Tabelle 2.4: In Anspruch genommene Dienstleistungen.....	36
Tabelle 4.1: Potentielle Zielgene von CD133 in HEK293 CD133 ⁺ angereicherten versus CD133 ⁻ angereicherten Zellen unter Angabe der jeweiligen Regulation, der chromosomalen Lokalisation und Funktion des entsprechenden Gens.	60
Tabelle 4.2: Ausgewählte Zielgene von CD133, die bei HEK293 CD133 ^{-/+} angereichert und MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert gleichermaßen reguliert sind.	70
Tabelle 4.3: Regulation der mRNA von CD133 und den potentiellen Zielgenen in der RT-PCR sowie der qRT-PCR bei der Zelllinie MDA-MB468 siRNA transfiziert und im Microarray bei der Zelllinie HEK293 CD133 ⁻ angereichert .	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der derzeitigen Theorien der Krebsentstehung.....	6
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)	8
Abbildung 1.3: Genomische Struktur der Promoterregion von humanem CD133	11
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des CD133 Proteins	13
Abbildung 4.1: Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie HEK293 CD133 ^{-/+} angereichert	72
Abbildung 4.2: Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert.....	74
Abbildung 4.3: HEK 293 nach 6 Tagen bei 21% O ₂ links und bei 0,1% O ₂ rechts im Bild.	77
Abbildung 4.4: HeLa nach 6 Tagen bei 21% O ₂ links und bei 0,1% O ₂ rechts im Bild.	78
Abbildung 4.5: CaCo-2 nach 6 Tagen bei 21% O ₂ links und bei 0,1% O ₂ rechts im Bild.	78
Abbildung 4.6: MDA-MB468 nach 6 Tagen bei 21% O ₂ links und bei 0,1% O ₂ rechts im Bild.	78
Abbildung 4.7: Auswertung der Proliferation von vier verschiedenen Zelllinien bei 21% O ₂ und 0,1% O ₂ nach neun Tagen.....	79
Abbildung 4.8: Durchflusszytometrisch gemessene MHCI Expression der Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 21% O ₂ und 0,1% O ₂	81
Abbildung 4.9: Durchflusszytometrisch gemessene CD133 Expression der Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 21% O ₂ und 0,1% O ₂	82
Abbildung 4.10: qRT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinie CaCo-2 für CD133 und die potentiellen Zielgene	83
Abbildung 4.11: qRT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 für CD133 und die abhängigen Zielgene	84
Abbildung 4.12: CaCo-2 nach 5 Tagen bei 10% FCS links und unter Nährstoffentzug bei 1% FCS rechts im Bild.....	85
Abbildung 4.13: MDA-MB469 nach 5 Tagen bei 10% FCS links und unter Nährstoffentzug bei 1% FCS rechts im Bild.....	86
Abbildung 4.14: Proliferation von den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 nach drei Tagen bei 10% FCS und 1%FCS	86
Abbildung 4.15: Proliferation von den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 nach 5 Tagen bei 10% FCS und 1%FCS	87

Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 10% FCS und 1% FCS nach drei Tagen	88
Abbildung 4.17: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 10% FCS und 1% FCS nach fünf Tagen	89
Abbildung 4.18: CaCo-2 nach 48 Stunden. Links zu sehen ist die Kontrolle, rechts diejenigen CaCo-2 nach Zugabe von TGF β	91
Abbildung 4.19: CaCo-2 nach 72 Stunden. Im linken Bild ist die Kontrolle zu sehen, im rechten die Zellen nach Zugabe von TGF β	91
Abbildung 4.20: qRT-PCR der Zelllinie CaCo-2 für die relative Expression der mRNA von CD133, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin nach 48 Stunden ohne und mit Zugabe von TGF β	93
Abbildung 4.21: qRT-PCR der Zelllinie CaCo-2 für die relative Expression der mRNA von CD133, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin nach 72 Stunden ohne und mit Zugabe von TGF β	94
Abbildung 4.22: Links im Bild HEK293 CD133 ⁻ ^{angereichert} nach 10 Tagen bei 1000 ausplattierten Zellen, rechts im Bild das Gleiche für HEK293 CD133 ⁺ ^{angereichert}	95
Abbildung 4.23: Links im Bild HEK293 CD133 ⁻ ^{angereichert} nach 10 Tagen bei 2000 ausplattierten Zellen, rechts im Bild das Gleiche für HEK293 CD133 ⁺ ^{angereichert}	96
Abbildung 4.24: Auswertung der Zelllinie HEK293 CD133 ^{-/+} ^{angereichert} im Colony Formation Assay nach 10 Tagen	96
Abbildung 4.25: MDA-MB468 im Colony Formation Assay im 24-well nach 10 Tagen bei 5000 ausplattierten Zellen.....	97
Abbildung 4.26: Invasion eines Fibroblastenzellverbundes nach 72 Stunden durch HEK293 CD133 ⁻ ^{angereichert} links im Bild und durch HEK293 CD133 ⁺ ^{angereichert} rechts.....	99
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des HIF-Signalwegs	111

1 Einleitung

1.1 Krebs

Im Jahr 2012 erkrankten laut WHO 12 Millionen Menschen weltweit neu an Krebs und 8,2 Millionen Menschen starben an dieser Krankheit. Die jährliche Inzidenz soll dabei in den nächsten 20 Jahren noch weiter auf geschätzte 22 Millionen steigen (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>). 30% der Krebstoten könnten durch einen gesünderen Lebensstil, d.h. regelmäßige physische Aktivitäten, gesunde Ernährung, Vermeidung von Übergewicht, Alkohol- und Nikotinkarenz sowie medizinische Vorsorgeuntersuchungen, vermieden werden. Außer diesen beeinflussbaren Umweltfaktoren konnten in den letzten Jahren auch Infektionen mit Viren und Bakterien und genetische Dispositionen als Ursache für die Entstehung von Krebs verantwortlich gemacht werden. Beispielsweise führt das Gen BRCA aufgrund von Mutationen zu 5% aller Mamma-Karzinom Erkrankungen bei Frauen (Heisey *et al.* 1999). Dadurch kann mittlerweile durch frühzeitiges Erkennen des Patientenkollektivs, das Mutationsträger ist, eine neue Therapiestrategie effektiv eingeleitet werden. Viele andere genetische Dispositionen gilt es in der Zukunft noch zu entschlüsseln, um auf den Patienten zugeschnittene Behandlungen zu ermöglichen. Die Infektion mit dem Bakterium *H. pylori* (*Helicobacter pylori*) ist u.a. verantwortlich für die Entstehung des Magen-Karzinoms und des Lymphoms des Gastrointestinaltrakts (Parsonnet *et al.* 1994). Auch virale Infektionen, bspw. mit HBV (Hepatitis B), HCV (Hepatitis C), HIV (humanes Immundefizienz Virus) oder HPV (humanes Papillomavirus) können im Menschen karzinogen wirken (Parkin 2011). HPV (v.a. Typ 16 und 18) kann z.B. ein Zervix-Karzinom induzieren. Mittlerweile gibt es eine Impfung gegen HPV, wodurch die Inzidenz des Zervix-Karzinoms beim vakzinieren Patientenkollektiv rückläufig war (Alemany *et al.* 2014).

Da Krebs weltweit nach kardiovaskulären und Infektionserkrankungen die dritthäufigste Todesursache darstellt, kommt der Forschung zur Entwicklung neuer Ansätze für die Krebstherapie und zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Erkrankung eine immer größere Bedeutung zu. Eines der wichtigsten Ziele in unserer heutigen Gesellschaft bei noch weiter steigender

Lebenserwartung stellt dabei die Senkung der Mortalität durch Entdeckung von Krebserkrankungen in möglichst frühem Stadium und Einleitung einer effektiven Therapie dar.

1.1.1 Karzinogenese

Bis zum Auftreten eines soliden Tumors, der ursprünglich aus entarteten Zellen epithelialen Ursprungs entsteht, benötigt es auf molekularer Ebene eine Vielzahl chromosomaler Abberationen und Mutationen, die sich über Jahre bis Jahrzehnte bilden. Erst die Anhäufung weiterer genetischer Alterationen führt gemeinsam mit dem Versagen der zellulären Reparaturmechanismen von einer prämaligen Zelle zur unkontrollierten Proliferation und Invasion in gesundes umliegendes Gewebe. Kinzler und Vogelstein postulieren, dass bis zur Entstehung von Krebs mindestens sieben genetische Ereignisse notwendig sind (Kinzler and Vogelstein 1996). Auch weitere Autoren charakterisieren diese Vorgänge (Hanahan and Weinberg 2000). Das Wort Karzinogenese bezeichnet diesen komplexen, mehrstufigen Prozess der Bildung von Tumoren aus Epithelzellen, der auch bis heute noch nicht vollständig erforscht und verstanden ist.

Sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie führen zum malignen Wachstum (Hanahan and Weinberg 2000): Autarkie gegenüber Wachstumssignalen, Sensitivitätsverlust gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, Resistenz gegenüber programmiertem Zelltod, uneingeschränktes replikatives Potential, kontinuierliche Angiogenese und Gewebeinvasion bzw. Metastasierung an entferntere Orte. Später wurden noch zwei weitere wichtige Merkmale hinzugefügt: die Reprogrammierung des Energiestoffwechsels zur besseren Adaption der Tumorzellen an die Mikroumgebung und das Entkommen dieser genetisch mutierten Zellen vor der Immunantwort (Hanahan and Weinberg 2011). Diesen Veränderungen liegen eine genomische Instabilität und dauerhafte Entzündungsreaktion zu Grunde.

Näher betrachtet kommt der Verlust der Zellreparaturmechanismen durch zwei verschiedene Wege zu Stande: zum einen durch einen Schaden an Tumor-Suppressor-Genen, zum anderen durch eine dauerhafte Aktivierung von Proto-Onkogenen.

Das Tumor-Suppressor-Gen p53 bspw. spielt eine bedeutende Rolle beim Schutz vor Krebs, indem es reguläre Stoffwechselvorgänge der Zelle überwacht und das Schicksal der Zelle determiniert (Vogelstein *et al.* 2000). P53, auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 1992), ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener Gene reguliert (Vousden and Prives 2009). P53 modifiziert eine Vielzahl von Prozessen, verhindert die unkontrollierte Proliferation von Zellen, steuert die Reparatur von DNA-Schäden, optimiert die Zellphysiologie und induziert gegebenenfalls die Apoptose von Zellen bei irreparabler Schädigung der DNA (Jiang *et al.* 2013). P53 ist in der Mehrzahl von Tumoren inaktiviert (Junttila and Evan 2009). Weitere bekannte Tumorsuppressor-Gene sind das Rb-Protein, BAX sowie p21.

Eine dauerhafte Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Mutationen führt zu einer unkontrollierten Proliferation von Zellen. Beispiele für Mutationen, die Proto-Onkogene in Onkogene umwandeln, sind Punktmutationen, chromosomale Abberationen, Insertionen sowie Deletionen. Ein bekanntes Beispiel für ein solches Proto-Onkogen ist B-raf, durch dessen Mutation der MAP-Kinase-Signalweg konstitutiv aktiviert ist. Bei 40% aller Melanome konnte eine aktivierende Mutation des B-raf-Proteins nachgewiesen werden (Davies and Samuels 2010). Weiterhin bekannt ist die Mutation in der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase), die in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen wurde (Jiang and Liu 2009). Diese Veränderung führt zu einem der häufigsten dysregulierten zellulären Signalwege bei Krebs (Yuan and Cantley 2008).

1.1.2 Theorien der Krebsentstehung

Der heutige wissenschaftliche Stand umfasst zwei verschiedenen Theorien wie es zur Entstehung von Krebs kommt: Die klonale Selektionstheorie und die Tumorstammzelltheorie beschreiben zwei potentielle Szenarien zur Krebsentstehung. Beide Theorien basieren dabei auf der Annahme einer Anhäufung von Mutationen wie oben beschrieben.

Die klonale Selektionstheorie wurde bereits 1976 veröffentlicht und beschreibt, dass Neoplasien von ursprünglich einer einzigen entarteten Zelle ausgehen. Die Tumorprogression resultiert aus erworbenen genetischen Veränderungen

dieses einen Klon, wobei aufeinander folgende Mutationen zu noch aggressiveren Krebszellen führen, die einen weiteren Selektionsvorteil im Mikromilieu des Tumors und eine erhöhte Proliferation aufweisen (Nowell 1976).

Die nach dem heutigen Wissensstand neuere der beiden Theorien, ist die der Tumorstammzellen. Es wird davon ausgegangen, dass nicht alle Zellen in einem Tumor dasselbe onkogene Potential aufweisen, sondern dass vielmehr nur eine kleine Subpopulation von Zellen im Tumor in der Lage ist neue Tumore zu generieren. Somit ist ein solider Tumor ähnlich gesundem Gewebe hierarchisch aufgebaut und wird von den Tumorstammzellen unterhalten. Der Beleg für diese Theorie beruht auf Maus-Modellen bei denen humane Tumorzellen immunsupprimierten Mäusen xenotransplantiert werden (Visvader and Lindeman 2008). Tumor-initiierende Zellen weisen den Stammzellen ähnliche Eigenschaften auf und werden auch TICs (tumor initiating cells) genannt. Der Begriff TIC soll auch im Weiteren verwendet werden. Die Möglichkeit einer erheblichen Plastizität von TICs, d.h. die Veränderung von Anatomie und Funktion der Zellen, einhergehend mit einer Verwandlung von TICs in differenziertere Zellen könnte ebenfalls zur Karzinogenese beitragen (Gupta *et al.* 2009). Denn während des Prozesses der Tumorentwicklung werden Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften benötigt, die bspw. so weit ausdifferenziert sind, dass sie Angiogenese induzieren oder Hormone produzieren können. Die Ähnlichkeit von Stammzellen und TICs liegt in der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in alle Zellen des Körpers bzw. Organs (Terskikh *et al.* 2006, Irollo and Pirozzi 2013). Auch die Möglichkeit der Dissemination von Zellen an entfernte Orte im Körper ist ein wichtiges Merkmal von TICs (Reya *et al.* 2001). Außerdem wurde festgestellt, dass TICs auf eine Radio- und herkömmliche Chemotherapie schlechter ansprechen, d.h. eine höhere Resistenz aufweisen (Lu and Shervington 2008, Bourguignon *et al.* 2014). Somit ist das Ziel zukünftiger Forschungsansätze neue Therapiemodalitäten, die v.a. speziell gegen TICs gerichtet sind, zu erforschen und somit das Therapieansprechen zu verbessern sowie das Auftreten von Rezidiven zu minimieren.

Bis heute konnte noch nicht abschließend geklärt werden, welche der beiden Hypothesen das tatsächliche Geschehen in der Tumorentstehung beschreibt oder ob beide Theorien in unterschiedlichen Tumorentitäten existieren. Die fol-

gende Abbildung 1.1 zeigt schematisch die derzeitigen Theorien der Krebsentstehung (Laks *et al.* 2010).

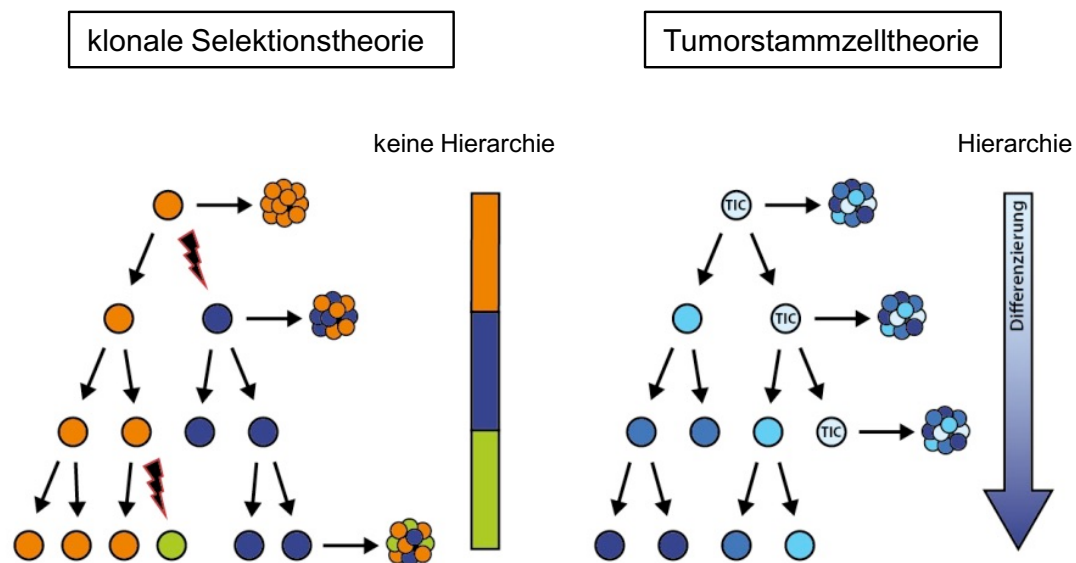


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der derzeitigen Theorien der Krebsentstehung. Links zu sehen ist die klonale Selektionstheorie ohne hierarchischen Aufbau der Tumorbildung. Die Neoplasie geht von einer einzigen entarteten Zelle aus, die im Laufe der Zeit weitere Mutationen, durch Blitze dargestellt, erfährt. Therapeutisches Ziel sind dabei Zellen aller drei gezeigten Farben. Rechts im Bild die Tumorstammzelltheorie mit TICs (Tumor initiating cells), von denen die Tumorbildung ausgeht. Ausschließlich die TICs gelten dabei als therapeutisches Angriffsziel (Laks *et al.* 2010).

1.1.3 Tumor initiating cells (TICs) und tumorassoziierte Antigene

In vivo konnte anhand von Mausmodellen gezeigt werden, dass TICs stark karzinogen sind, d.h. bereits wenige Zellen ausreichen, um nach Xenotransplantation in Mäusen Tumore zu bilden (Geissler *et al.* 2012). Unklar ist, ob diese TICs aus einer entarteten Stammzelle oder einer differenzierten Zelle durch karzinogene Mutationen entstehen (siehe Abbildung 1.1). Signalwege wie der Wnt/ β -Catenin oder der Sonic Hedgehog Signalweg sind in TICs häufig aktiviert und an Wachstum, Überleben, Invasion und Medikamentenresistenzen von TICs beteiligt (Mimeault *et al.* 2007). Außerdem haben TICs die Fähigkeit verankerungsunabhängig zu wachsen. Dies ist experimentell definiert als die Bildung von Sphäroiden *in vitro* (Gibbs *et al.* 2005). Die Isolation von TICs aus Tumorgewebe basiert auf der verstärkten Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche der TICs. Beispiele für Zelloberflächenmarker von TICs sind:

CD133, CD24, CD44, CD166 und EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) (Singh *et al.* 2004a, Bretz *et al.* 2012, Meng *et al.* 2012, Yamashita *et al.* 2013, Yan *et al.* 2013). Diese Oberflächenmoleküle, die ebenso auf Krebszellen detektiert werden können, sind auch bei verschiedenen Tumorentitäten von großer prognostischer Bedeutung: Je stärker die Expression bestimmter Zelloberflächenmarker auf einem Tumor ist, umso schlechter ist die Prognose in Bezug auf das Überleben und höher die Rezidivrate sowie die Bildung von Metastasen. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund einer bis zu 90% starken Assoziation von Metastasen mit einer erhöhten Mortalität wichtig. Auch die Tumorfornation *in vivo* ist bei starker Expression der zuvor genannten, tumorassoziierten Antigene häufig höher. Meist wird für die Isolation von TICs eine Kombination verschiedener Antigene, abhängig von der Tumorentität, verwendet. Beim HCC (hepatozelluläres Karzinom) kommt bspw. eine Kombination der Marker EpCAM und CD90 zum Einsatz (Yamashita *et al.* 2013). Durch ein verbessertes Verständnis der Expression und insbesondere der Funktion von TIC Markern wird es in Zukunft hoffentlich möglich werden, Tumoren zielgerichtet zu behandeln, um die Mortalität senken zu können. Dies ist neben der Erkennung von Krebs im Frühstadium eines der vielversprechendsten Therapieziele für die Zukunft. Außerdem ist eine *targeted therapy*, d.h. eine auf die Tumorantigene des individuellen Patienten zugeschnittene Therapie, durch Entwicklung neuer zielgerichteter Medikamente wirkungsvoller im Kampf gegen die Krankheit Krebs (Mizrak *et al.* 2008).

1.1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Krebsprogression

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein physiologischer Prozess, der während der embryonalen Entwicklung abläuft, jedoch auch im Zuge der Krebszellinvasion und Metastasierung aktiviert wird (Pirozzi *et al.* 2011). Eine gesunde Epithelzelle zeigt Polarität und interagiert über ihre Basalfläche mit der Basalmembran. Während der EMT jedoch durchläuft eine Epithelzelle mehrere biochemische Veränderungen, die dazu führen, dass die Zelle einen mesenchymalen Phänotyp annimmt, sowie verbessertes Migrationsvermögen, Invasivität, erhöhte Resistenz gegen Apoptose und starkes Disseminationsvermögen zeigt (Kalluri and Weinberg 2009). Im Verlauf der EMT verlieren Epithelzellen

epitheliale Marker wie E-Cadherin, Zytokeratin, Laminin-1 und Desmoplakin. Mesenchymale Marker wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronektin steigen an und die Morphologie sowie die Eigenschaften der Zelle verändern sich zum mesenchymalen Zelltyp (Thiery *et al.* 2009). Dies geht mit einem Verlust der Polarität der Zelle und Durchbruch der Basalmembran einher. In Abbildung 1.2 ist schematisch die EMT (epithelial-mesenchymale Transition) dargestellt.

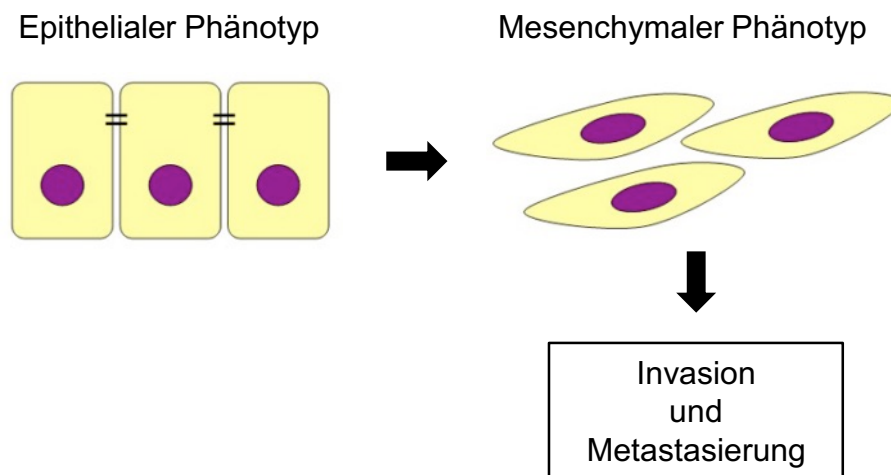


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Als Antwort auf extrazelluläre Signale, verlieren die Zellen epitheliale Marker und nehmen einen fibroblastenartigen Phänotyp an. Die EMT ist eng assoziiert mit dem Erwerb aggressiver Merkmale der Krebszellen. Die betroffenen Epithelzellen verlieren ihre Polarität sowie Zelladhäsionen und erwerben dann sowohl migratorische als auch invasive Eigenschaften, d.h. sie differenzieren zu Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp (Irollo and Pirozzi 2013).

Auch für die Regeneration von Gewebe, Organfibrosierung, Differenzierung und Krebsprogression spielt die EMT eine essentielle Rolle (Thiery *et al.* 2009). Es wurde herausgefunden, dass bestimmte EMT-Regulatoren wie Snail/Slug, Twist und Six1 während Migrationsprozessen in der Embryonalentwicklung und in verschiedenen malignen Tumorentitäten exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine ektopische Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren die Metastasierung mutierter Zellen hervorgerufen wird und die klinische Prognose dem entsprechend schlecht ist (Micalizzi *et al.* 2010). Die EMT wurde 1995 erstmals beschrieben (Hay 1995) und anfangs Transformation genannt bis die Reversibilität des Prozesses entdeckt wurde und die Bezeichnung in Transition geändert wurde. Die Plastizität von Tumorzellen ist so stark ausgeprägt, dass diese eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) durchlaufen und somit wieder einen epithelialen Phänotyp annehmen können. EMT und

MET könnten zukünftig einen therapeutischen Ansatzpunkt im Kampf gegen die Metastasierung darstellen (Kalluri and Weinberg 2009).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die EMT eine Schlüsselrolle für die migrierende, invasive Krebszelle spielt und somit zur Tumorprogression sowie Metastasierung beiträgt. Dadurch dass die Zellen migratorische Eigenschaften annehmen, können sie auch vom Primärtumor weit entfernte Gewebe und Organe im Körper erreichen. Am neuen Ort angekommen, siedeln sie sich dort an und gehen entweder anfangs in einen Ruhezustand über, um erst nach Jahren weitere Zellteilungen vorzunehmen oder sie bilden durch eine akzelerierte Proliferation sofort Metastasen. Während die EMT also an der lokalen Invasion, Zirkulation und Disseminierung maßgeblich beteiligt ist, spielt die MET wiederum eine essentielle Rolle für das Auswachsen von Metastasen (Joyce and Pollard 2009).

1.2 CD133 (Cluster of differentiation 133)

CD133 steht für Cluster of differentiation 133. CD133 ist ein pentahelikales, transmembranes Glykoprotein und wurde 1997 erstmals in Zusammenhang mit CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie der ALL (akute lymphatische Leukämie) und AML (akute myeloische Leukämie) beschrieben (Miraglia *et al.* 1997). Etwa zeitgleich wurde CD133 auch im murinen Neuroepithel, verschiedenen anderen Epithelien des Mausembryos und in der adulten Maus in der Niere und im Gehirn entdeckt (Weigmann *et al.* 1997). Entsprechend ist CD133 ein evolutionär hoch konserviertes Protein (Fargeas *et al.* 2003b). Das AC133 Antigen, die hyperglykosylierte Form von CD133 wird überwiegend in Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert (Yin *et al.* 1997, Gires 2011). Somit stellt CD133 einen Marker für frühe Vorläuferzellen dar (Handgretinger *et al.* 2003).

Aus Operationsresektaten isolierte CD133⁺ Tumorzellen wurden *in vitro* kultiviert und wiesen Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Proliferation und pluripotente Differenzierung auf (Singh *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von CD133 in bestimmten Tumoren, wie bspw. dem humanen Ovarialkarzinom sowie dem Kolonkarzinom, mit einer Subpopu-

lation von TICs assoziiert ist (Guo *et al.* 2011, Mak *et al.* 2012). CD133 wird auch als tumorassoziiertes Antigen bezeichnet, da es ein Protein ist, welches in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Gewebszellen stark überexprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist CD133 jedoch kein tumorspezifisches Antigen, da diese ausschließlich von Krebszellen, nicht von intakten Zellen, exprimiert werden. CD133 kann bspw. auch in gesundem Gewebe wie der menschlichen Retina nachgewiesen werden. In anderen Gewebeentitäten wie reifen Endothelzellen oder Monozyten wird CD133 jedoch wiederum überhaupt nicht exprimiert (Handgretinger *et al.* 2003). Außerdem führt ein Verlust der CD133 Funktion in der Netzhaut des Auges durch eine Mutation zur retinalen Degeneration, jedoch keinen weiteren Pathologien (Fargeas *et al.* 2003b).

Auch die Überlebensrate von Patienten ist bei bestimmten Tumorentitäten wie zum Beispiel beim Kolon-Karzinom (Oliver *et al.* 2014) und beim NSCLC (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) (Wang *et al.* 2014, Wu *et al.* 2014b), bei einer starken CD133-Expression verringert. Auch beim Mamma-Karzinom korrelierte die Überexpression von CD133 mit einer schlechteren Prognose, jedoch nicht als alleiniger Marker, sondern in Verbindung mit N-Cadherin (Bock *et al.* 2014). Das gleiche gilt auch für das Pankreas-Karzinom gemeinsam mit CD44 und TF (tissue factor) (Chen *et al.* 2014).

In der verfügbaren Literatur gibt es zwei Synonyme, die für CD133 gebräuchlich sind: AC133 für die hyperglykosylierte Form von CD133 und Prominin-1. Wobei der Begriff AC133 früher häufiger gebraucht wurde. Mittlerweile konnten spezifischere Antikörper, die unabhängig vom Glykosylierungszustand des Proteins binden, entwickelt werden (Florek *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit soll im Weiteren die Verwendung des Begriffs CD133 für die glykosylierte Form des Proteins übernommen werden. Im Folgenden werden der aktuelle Wissensstand über das CD133 Gen, das CD133 Protein, das Expressionsmuster und die Funktion von CD133 zusammengefasst.

1.2.1 Das CD133 Gen und seine Regulation

Das *PROM1* Gen kodiert für das CD133 Protein (Gen ID: 8842) und befindet sich auf dem Chromosom 4p15.32. Es ist weiterhin unter den Synonymen RP41, AC133, MCDR2, STGD4, CORD12, PROML1 und MSTP061 bekannt.

Das Gen kodiert für ein glykosyliertes Protein, welches ein Molekulargewicht von 120 kDa aufweist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8842>). Die isolierte cDNA von CD133 kodiert für ein Polypeptid, das aus 865 Aminosäuren besteht und in unglykosylierter Form ein Molekulargewicht von 97 kDa hat. CD133 besteht aus fünf Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Miraglia *et al.* 1997, Yin *et al.* 1997).

Es gibt mindestens fünf verschiedene Promotoren, welche die Transkription von CD133 kontrollieren. Je nach Gewebe sind diese Promotoren unterschiedlich stark aktiv (Shmelkov *et al.* 2004). Mehrere Transkriptionsvarianten, die für verschiedene Isoformen des Proteins kodieren, wurden für CD133 beschrieben. Das Gen CD133 hat mindestens 9 charakteristische 5'UTR-Exons. Diese untranslatierten Regionen, die den Startpunkt der Transkription markieren, sind wichtig für die nachfolgende effiziente sowie kontrollierte Translation. Daraus resultiert die Bildung von wenigstens 8 verschiedenen Isoformen der CD133 mRNA. In unterschiedlichen Geweben werden diese differenziell exprimiert. So konnte bei der Maus gezeigt werden, dass im Hoden ausschließlich die Splecevarianten (SV) 3 und 7 exprimiert werden, während SV8 nur im Auge detektiert wurde (Kemper *et al.* 2010b). Die Transkription dieser CD133 Isoformen wird durch die 5 unterschiedlichen Promotoren P1-P5 kontrolliert. Dabei liegen die Promotoren P1-P3 in CpG-Inseln (Tabu *et al.* 2008). Kürzlich wurde noch ein sechster Promotor P6 in Melanomzellen und Stammzellen entdeckt, der ebenfalls die Expression von CD133 mRNA reguliert (Sompallae *et al.* 2013). Abbildung 1.3 zeigt die genomische Struktur der Promotorregion von humanem CD133 mit den alternativen Promotoren P1-P5.

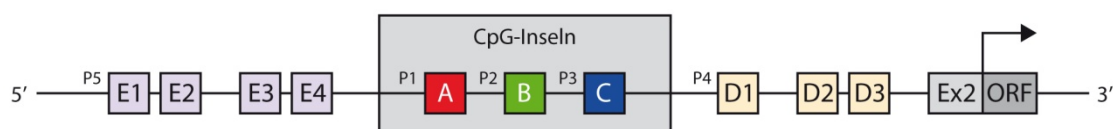


Abbildung 1.3: Genomische Struktur der Promotorregion von humanem CD133. P1-P5 sind alternative Promotoren für das Gen CD133. Die Exons A-C inklusive ihrer entsprechenden Promotoren P1-P3 sind in CpG-Inseln lokalisiert. Die Transkription wird dort durch CpG-Methylierung reguliert. Die Translationsinitiation beginnt bei Exon 2 (Ex2) direkt neben dem offenen Leserahmen (ORF) (Tabu *et al.* 2008).

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Promotoren P1 und P2 durch Methylierung von Lysinresten des Histons H3 komplett supprimiert wurde. Dies lässt auf eine wichtige Rolle der Methylierung bei der Regulation der CD133-Transkription schließen (Shmelkov *et al.* 2004, Yi *et al.* 2008). Durch eine Demethylierung *in vitro* mittels 5-Azacytidin Behandlung konnte die Expression von CD133 in Gliomzellen wiederhergestellt werden. Das heißt die Hypomethylierung der DNA wurde als wichtige Determinante für die CD133-Expression in Tumorzellen gewertet (Tabu *et al.* 2008). Da jedoch die Promotoren P1-P3 sowohl in gesundem Kolon-Epithel, als auch in differenzierten Kolonkarzinomzellen und TICs gleichermaßen aktiv waren, konnte keine Regulation auf Transkriptionsebene für CD133 festgestellt werden. Deshalb wird eine Regulierung auf translationalem bzw. posttranslationalem Level vermutet (Kemper *et al.* 2010a).

In mehreren Tumorentitäten konnte eine gegenläufige Regulation des Methylierungsstatus und der CD133 Promotoraktivität wie bspw. beim Kolon-Karzinom (Yi *et al.* 2008), beim Ovarialkarzinom (Min *et al.* 2012), beim HCC (Zhang *et al.* 2011), beim Neuroblastom (Schiapparelli *et al.* 2010) und beim Glioblastom (Gopisetty *et al.* 2013) gezeigt werden. Zusätzlich zeigte die Untersuchung von Gopisetty *et al.* eine Regulation der CD133-Expression durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und c-Myc. Diese haben die Fähigkeit an den Promotor direkt zu binden, ihn zu aktivieren und dadurch die CD133-Expression zu erhöhen. Durch Hemmung der beiden Transkriptionsfaktoren konnte die Transkription wiederum inhibiert werden (Gopisetty *et al.* 2013). Andererseits zeigte die Untersuchung von gesundem Prostatagewebe und Prostata-Karzinomzellen, dass die Expression von CD133 unabhängig vom Methylierungsstatus der Promotoren war. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass außer dem Methylierungsstatus und dem Einfluss von Transkriptionsfaktoren auch der Kondensationszustand des Chromatins einen Einfluss auf die CD133 Expression hat. Die Kondensation des Chromatins jedoch wiederum, wird u.a. auch durch Histon-Methylierung bewirkt. Dabei war kondensiertes Chromatin mit einer Herunterregulation der Transkription von CD133 assoziiert. Durch Hemmung der Histondeacetylase konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden (Pellacani *et al.* 2011). Gleiche Ergebnisse konnten außer bei Prostatakarzinomzellen auch bei Glioblastomzellen erzielt werden. Durch die Behandlung der Tumorzellen mit

dem Histondeacetylase-Inhibitor Valproinsäure erhöhte sich die CD133 mRNA-Expression (Tabu *et al.* 2008). CD133-negative Ovarialkarzinomzellen, die mit DNA Methyltransferase und/oder Histondeacetylase-Inhibitoren behandelt wurden, zeigten einen Anstieg der CD133-Expression auf Oberflächenproteinebene (Baba *et al.* 2009).

1.2.2 Die Struktur des CD133 Proteins

CD133 war das erste identifizierte Mitglied einer neuen Familie von Membranproteinen, das im kompletten Tierreich konserviert ist (Corbeil *et al.* 2001b). Es besitzt 5 Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus, der 85 Aminosäuren enthält und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Miraglia *et al.* 1997). Der C-Terminus ist mit 50 Aminosäuren relativ kurz und enthält 5 Tyrosinreste, mitunter eine Tyrosin Phosphorylierungsstelle, deren Bedeutung noch nicht näher erforscht ist. Die Phosphorylierung könnte u.a. auch eine Rolle für die Regulation der Funktion spielen (Boivin *et al.* 2009). Die beiden extrazellulären Schleifen sind mit 255 und 290 Aminosäuren außerordentlich groß und enthalten 4 mögliche N-verbundene Glykosylierungsstellen. Die zwei kleinen zytoplasmatischen Schleifen sind zysteinreich. Das Molekulargewicht des Antigens beträgt 120 kDa (Corbeil *et al.* 2001a). Die folgende Abbildung 1.4 zeigt schematisch den Aufbau des CD133 Proteins.

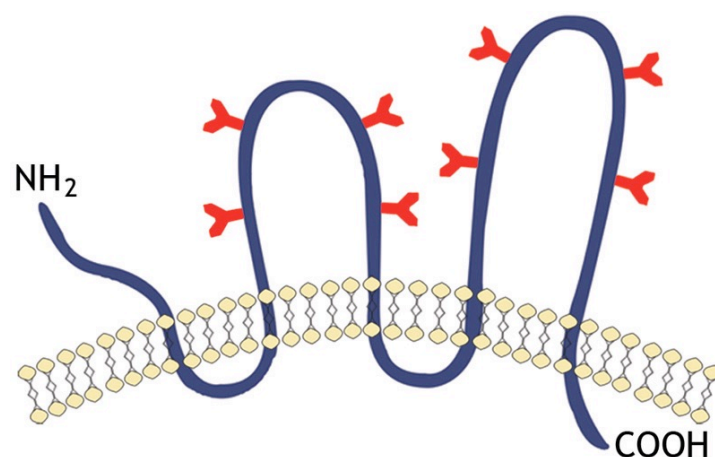


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des CD133 Proteins. Zu erkennen sind die fünf Transmembrandomänen, die zwei kleinen intrazellulären Schleifen und zwei großen extrazellulären Schleifen mit jeweils vier potentiellen N-verbundenen Glykosylierungsstellen, die als rote Gabeln dargestellt sind. Zytoplasmatisch befindet sich die C-terminale Domäne und extrazellulär ist der N-Terminus lokalisiert (Irollo and Pirozzi 2013).

1997 wurde erstmals ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der das AC133 Epitop von CD133 erkannte. Das AC133 Epitop befindet sich in der zweiten extrazellulären Schleife des Antigens CD133 (Miraglia *et al.* 1997, Yin *et al.* 1997). Da dieser Antikörper jedoch nur an das glykosylierte Epitop von CD133 bindet, konnte durch ihn nicht zwangsläufig jegliches CD133 identifiziert werden. Die nach Detektion durch Antikörper isolierte cDNA von CD133 kodiert für einen einzelnen offenen Leserahmen bestehend aus 2595 Nukleotiden und sagt ein 865 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 97 kDa vorher (Yin *et al.* 1997). Dies entspricht dem Gewicht nach Abspaltung der N-terminalen Domäne, die die ersten 19 Aminosäuren enthält (Boivin *et al.* 2009). Jahre später wurde von Florek *et al.* ein neuer Antikörper (α hE2) definiert, der humanes CD133 unabhängig vom Glykosylierungsstatus erkannte. Dies erlaubte die Detektion von CD133 auf der apikalen Membran des proximalen Tubulus der adulten Niere und in der Brustdrüse. Es konnte nachgewiesen werden, dass während der Differenzierung von Kolonkarzinomzellen sich bei einem Rückgang von AC133 die Expression von CD133 nicht veränderte, wie vorher fälschlicherweise angenommen worden war. Die Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung war die Annahme, dass nur das AC133 Epitop während der Differenzierung herunterreguliert wird, die CD133-Expression sich jedoch nicht verändert. Das heißt der Glykosylierungsstatus von CD133 und nicht die Expression wird im Laufe der Differenzierung verändert (Florek *et al.* 2005, Kemper *et al.* 2010a).

Etwa zur gleichen Zeit wurde Prominin-2 entdeckt, das viele Gemeinsamkeiten mit CD133 wie eine ähnliche Struktur und eine Expression aufweist und dessen Expression auf Ausstülpungen der Plasmamembran beschränkt ist. Deshalb kam es auch zur Namensgebung, da Prominin von Lateinisch *prominere* (dt.: hervorstehen) abgeleitet wurde (Fargeas *et al.* 2003a). Auch die Gewebsverteilung der beiden Antigene stimmt weitestgehend überein: Prominin-2 konnte in der adulten Niere, im kompletten Verdauungstrakt und vielen anderen epithelialen Geweben detektiert werden (Fargeas *et al.* 2003b).

Die genomische Struktur von CD133 ist zwischen verschiedenen Spezies extrem ähnlich wie bspw. die Exon/Intron-Grenzen. Dies wurde anhand verschiedener Primaten, sowie der Maus und der Ratte untersucht (Corbeil *et al.* 2001a,

Fargeas *et al.* 2007). Die Übereinstimmung zwischen humanem und murinem CD133 beträgt im Vergleich der Aminosäuresequenzen 60% und beide Proteine zeigen die gleiche Membrantopologie (Corbeil *et al.* 1998). Mittlerweile ist durch die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms bestätigt, dass das Gen CD133 das Ortholog zum murinen CD133 darstellt (Fargeas *et al.* 2003a). Diese große Übereinstimmung war bereits nach der Entdeckung des humanen und murinen CD133 Proteins vermutet worden (Corbeil *et al.* 1998).

1.2.3 Lokalisation, Splicevarianten, Proteinisoformen und posttranslationale Modifikation von CD133

CD133 ist vorzugsweise an der apikalen Zelloberfläche in Plasmamembranausstülpungen wie Mikrovilli lokalisiert (Weigmann *et al.* 1997). Dies sind bspw. Filopodia, Lamellipodia und Mikrospikes, welche reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind (Roper *et al.* 2000). In der adulten Niere konnte CD133 bspw. in der Bürstensaummembran nachgewiesen werden und in neuroepithelialen Zellen in Mikrovilli-ähnlichen Ausstülpungen (Weigmann *et al.* 1997). CD133 interagiert direkt mit in der Plasmamembran enthaltenem Cholesterol innerhalb einer eigenen Membran Mikrodomäne, im Englischen *lipid raft* (Bauer *et al.* 2008). Diese spezifische Konzentrierung in Plasmamembranausstülpungen in der apikalen Membran neuronaler TICs und anderen epithelialen Zelltypen konnte nachgewiesen werden (Marzesco 2013). Experimentell konnte *in vitro* belegt werden, dass Cholesterolabbau in einem Verlust der Mikrovilli-spezifischen Lokalisation von CD133 resultiert (Roper *et al.* 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren mehrere Autoren, dass CD133 eine Funktion in der Organisation der Plasmamembrantopologie, der Lipidzusammensetzung und für Membraninteraktionen spielt (Corbeil *et al.* 2001b, Mizrak *et al.* 2008). Ein Ausfall dieser CD133 Funktion zeigt sich folgendermaßen: Durch eine Mutation im CD133 Gen, die zu einer Leserasterverschiebung führt, wird die Translation vorzeitig abgebrochen und dem Protein fehlt dadurch die Hälfte der zweiten extrazellulären Schleife, die fünfte Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatische C-Terminus. Dieses gekürzte CD133 erreicht dann nicht mehr die Zelloberfläche wie *in vitro* nach Transfektion des mutierten CD133 Gens in Fibroblasten gezeigt werden konnte (Corbeil *et al.* 2001b). *In vivo* ist diese Mutation mit dem Krankheitsbild der retinalen Degeneration assoziiert.

CD133 zeigt in epithelialen Zellen und auch in anderen Zelltypen stets eine Expression in Membranprotusionen, wobei CD133 in Epithelzellen immer in der apikalen Membran vorhanden ist (Fargeas *et al.* 2004, Bauer *et al.* 2008). Durch den Nachweis verschiedener Splicevarianten von murinem CD133 konnte gezeigt werden, dass zwei der sechs untersuchten Splicevarianten die Zelloberfläche nicht erreichen, sondern im endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleiben. Wahrscheinlich ist dann eine Degradation dieser zwei Splicevarianten im ER. Ob dies auf eine falsche Proteinfaltung durch eine veränderte Aminosäurezusammensetzung, einen Fehler auf translationaler Ebene oder durch eine Mutation auf Transkriptionsniveau zurückzuführen ist, bleibt unklar (Fargeas *et al.* 2004). Auch in humanen Zellen wurden verschiedene Splicevarianten der CD133 mRNA detektiert, die zur Entstehung von sieben unterschiedlichen CD133 Proteinen führen (Shmelkov *et al.* 2004, Fargeas *et al.* 2007). Es wurde postuliert, dass die beiden großen extrazellulären Schleifen des humanen CD133 von alternativem Spleißen betroffen sind, was möglicherweise einen Einfluss auf die Anwesenheit unterschiedlicher Epitope und Glykosylierungen hat (Grosse-Gehling *et al.* 2013).

Auch in verschiedenen humanen Drüsenepithelien konnte CD133 in apikalen bzw. apikolateralen Membranen der polarisierten Zellen nachgewiesen werden. Dies gelang bspw. bei sekretorischen serösen und muzinösen Zellen, den großen Speicheldrüsen (*Glandulae Submandibularis*, *Sublingualis*, *Parotis*) und der Tränendrüse (Karbanova *et al.* 2008). Zusätzlich wurden CD133 enthaltende Membranpartikel in Körperflüssigkeiten von Erwachsenen, wie dem Urin, der Seminalflüssigkeit und dem Speichel, detektiert. *In vitro* zeigte sich die Freisetzung der CD133 enthaltenden Membranpartikel während der Kultivierung der endogen CD133-positiven Kolon-Karzinomzelllinie CaCo-2. Daraus wurde geschlossen, dass dieser Vorgang möglicherweise wichtig für die Entwicklung und den Stoffwechsel der Gewebe ist (Marzesco *et al.* 2005). Kurze Zeit später wurden auch CD133 enthaltende Membranpartikel, die von murinen neuroepithelialen Vorläuferzellen freigesetzt werden, entdeckt. Möglicherweise könnte dies einen Signalweg darstellen, um die Balance zwischen Differenzierung und Proliferation zu beeinflussen (Dubreuil *et al.* 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass bei Glioblastompatienten die Menge der CD133 enthaltenden Vesikel im Liquor im Vergleich zu gesunden Probanden anstieg. Es wurde geschlussfol-

gert, dass die Vesikel für die Zell-Zell-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen und zukünftig einen großen Wert als Biomarker für die Tumorgenese haben könnten (Marzesco 2013).

Die Glykosylierung ist einer der wichtigsten Mechanismen der ko- bzw. post-translationalen Modifikation von CD133. Auch die Sialylierung und andere post-translationalen Modifikationen scheinen signifikant an der Tumorprogression, speziell an der Invasion und Metastasierung, beteiligt zu sein (Li *et al.* 2010, Sgambato *et al.* 2010). Der Glykosylierungsstatus scheint mit der Differenzierung der Zelle assoziiert zu sein (Zhou *et al.* 2010). Beispielsweise ist die post-translationalen N-Glykosylierung des CD133 Proteins notwendig, damit das Protein die Zellmembran erreicht, in sie eingebaut wird und somit detektiert werden kann. Durch Tunicamycin-Behandlung, die die Biosynthese des N-Glykan-Vorläufers inhibiert, wurde *in vitro* die CD133 Stabilität und der Transport zur Zellmembran beeinträchtigt. Das Protein konnte nach Behandlung von Zellen mit Tunicamycin nicht mehr mittels Antikörper nachgewiesen werden. Wenn jedoch lediglich eine Glykosylierungsstelle mutiert war, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Bei einem kompletten Verlust der CD133 N-Glykosylierung durch Mutation aller Konsensussequenzen für die Glykosylierung konnte kein CD133 an der Zelloberfläche detektiert werden. Unglykosyliertes CD133 war dann jedoch im ER lokalisiert und wurde dort exprimiert. Somit scheint die Glykosylierung für die Stabilität des CD133 Proteins essentiell zu sein (Mak *et al.* 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD133⁺ Zellen im Vergleich zu CD133⁻ Zellen sowohl eine um 10% stärkere N-Glykosylierung, v.a. des Mannose-reichen Typs, als auch terminale α 2,3-Sialylierung hatten (Hemmoranta *et al.* 2007). Auch die Modifikation durch Sialylierung scheint zur Stabilität des CD133 Proteins beizutragen. Die Desialylierung von CD133 durch Neuraminidase in neuronalen Stammzellen und Gliom-initierenden Zellen, zeigte *in vitro* eine beschleunigte Degradierung von CD133 in Lysosomen sowie eine reduzierte Stabilität von CD133 (Zhou *et al.* 2010).

Außer durch Glykosylierung und Sialylierung kann der extrazelluläre N-Terminus des CD133 Proteins auch durch Ganglioside wie GM1 oder GD3 modifiziert werden. Die Ganglioside GM1 und GD3 kommen in der äußeren Hälfte von Zellmembranen vor, sind mit CD133 kolokalisiert und spielen eine wichtige

Rolle im Zellstoffwechsel (Vyas *et al.* 2001). Eine Interaktion der Ganglioside mit CD133 führt dazu, dass das Protein nicht mehr von allen gegen CD133 gerichteten Antikörpern detektiert wird, da die membranösen Ganglioside das AC133 Epitop maskieren können (Janich and Corbeil 2007, Taieb *et al.* 2009). Weitere Untersuchungen bezüglich des Gangliosids GD3 durch Donovan *et al.* zeigten, dass GD3 sowohl in CD133⁻ als auch in CD133⁺ Zellsubpopulationen überexprimiert wird und wahrscheinlich keine funktionelle Rolle im biologischen Verhalten von CD133 spielt. Die Menge von GD3 in der Zellmembran und eine Interaktion mit glykosyliertem CD133 am N-Terminus des Proteins könnten jedoch entscheidend für Stoffwechselvorgänge der Zelle sein und einen invasiven Phänotyp begünstigen (Donovan *et al.* 2012).

1.2.4 Die Funktion von CD133

Bis heute konnte die Funktion von CD133 in den verschiedenen Zelltypen noch nicht abschließend geklärt werden. Trotzdem nimmt die Wichtigkeit von CD133 als Tumorzellmarker stetig zu. Einige Signaltransduktionswege und Zell-Zell-Interaktionen, an denen CD133 beteiligt ist, konnten mittlerweile näher identifiziert werden.

Anfangs wurde CD133 als Oberflächenantigen beschrieben, das spezifisch auf humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird (Miraglia *et al.* 1997, Yin *et al.* 1997) und als Marker, der auf murinen embryonalen Zellen sowie verschiedenen anderen embryonalen Epithelien nachweisbar ist (Weigmann *et al.* 1997). Mittlerweile wird CD133, das zellunabhängig in Membranprotrusionen und Mikrovilli lokalisiert ist, eine Rolle in der Organisation der Plasmamembran-Topologie zugeschrieben, da es mit in der Membran enthaltenem Cholesterol in einer spezifischen Mikrodomäne (*lipid raft*) interagiert (Roper *et al.* 2000). Außerdem sind bestimmte Ganglioside wie GM1 mit CD133 in Mikrovilli kolokalisiert (Janich and Corbeil 2007). Diese ausgewählten Ganglioside könnten die Erreichbarkeit von CD133 an der N-terminalen Domäne für Antikörper modulieren und Zell-Zell-Interaktionen regulieren, an denen CD133⁺ Stammzellen involviert sind (Taieb *et al.* 2009). Ob CD133 jedoch aktiv an Prozessen in diesen Mikrodomänen, die den Stoffwechsel und die Organisation der

Zellmembran beeinflussen, beteiligt ist, konnte bislang nicht ausreichend erforscht werden.

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass CD133 wichtig für die Differenzierung von Stammzellen ist, da während der hämatopoetischen Zelldifferenzierung CD133 enthaltende Membranpartikel, auch Exosomen genannt, freigesetzt werden (Bauer *et al.* 2011). Exosomen transportieren nicht nur Membrankomponenten, sondern auch viele andere für den Zellstoffwechsel wichtige Bausteine zwischen verschiedenen Zellen, was ihre Wichtigkeit in der interzellulären Kommunikation unterstreicht. Sie werden nach der Fusion von multivesikulären Endosomen mit der Zellmembran sekretiert (Simons and Raposo 2009). Es wird davon ausgegangen, dass *lipid rafts*, die CD133 enthalten, eine Schlüsselrolle in der Erhaltung von Stammzeleigenschaften spielen und eine quantitative Reduktion oder der Verlust von CD133 die Zelldifferenzierung zur Folge haben (Bauer *et al.* 2011). CD133 in den Vesikeln interagiert direkt mit dem Membran-Cholesterol. Experimentell zeigte sich, dass ein verstärkter Abbau von Cholesterol in einem Anstieg der Vesikelfreisetzung und einer deutlichen Veränderung der Ultrastruktur der Mikrovilli mündet. Dies ist als Hinweis auf eine Freisetzung der Vesikel aus den Mikrovilli durch Cholesterol vermittelt zu werten (Marzesco *et al.* 2009). Die im Lumen des Neuralrohrs des murinen Gehirns befindliche Flüssigkeit enthält ebenfalls extrazelluläre CD133⁺ Membranpartikel. Es wurden während der frühen Phase der Neurogenese zwei verschiedene Partikel (P2 und P4) detektiert, wobei P4 eine Größe von 60-80 nm aufweist und verschieden zu den Exosomen ist. P2, ein 600 nm großes Teilchen, hingegen konnte in verschiedenen humanen Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel und Seminalflüssigkeit nachgewiesen werden. Es wird den Membranpartikeln ebenfalls eine Rolle in der Gewebeentwicklung und -erhaltung zugesprochen (Marzesco *et al.* 2005). Im Liquor von Glioblastom-Patienten konnte sogar ein Anstieg solcher Vesikel, vor allem von den kleineren der beiden Haupttypen von extrazellulären Membranvesikeln, beobachtet werden (Marzesco 2013).

Beim hepatozellulären Karzinom konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von CD133 die Resistenz gegenüber Apoptose bei einer Chemotherapie mit Doxorubicin und Fluorouracil erhöht. Auch eine Behandlung von unsortierten HCC Zellen mit diesen beiden Chemotherapeutika führt zu einem An-

stieg der CD133 Positivität, da die Zellen eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie erreichen wollen. Dieser Anstieg der CD133-Expression unter Therapie mit Doxorubicin und Fluorouracil ist zurückzuführen auf eine erhöhte Expression von Proteinen, wie bspw. des AKT1-Inhibitors, die am PI3K/Akt- und am Bcl-2-Signalweg beteiligt sind. Andersherum konnte gezeigt werden, dass sich die CD133-Expression signifikant reduziert, wenn der PI3K/Akt-Signalweg inhibiert wird. Dies deutet darauf hin, dass CD133⁺ HCC Zellen zur Chemoresistenz mittels Aktivierung des PI3K/Akt- und Bcl-2-Signalwegs beitragen (Ma *et al.* 2008). Auch unter Hypoxie, einem Umstand, der mitunter zur Progression verschiedener Tumoren führt, kommt es zu einem Anstieg von CD133 und des PI3K/Akt- sowie des ERK1/2-Signalwegs. Durch Inhibition der Signalwege konnte wiederum gezeigt werden, dass die CD133-Expression abnimmt, was vermuten lässt, dass diese Signalkaskaden die hypoxische Antwort modulieren. Die durch Hypoxie hervorgerufene Aktivierung von HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α), die zur Angiogenese im Tumor führt, verbessert die Selbsterneuerungsaktivität der CD133⁺ Zellen und inhibiert die Differenzierung der TICs. Eine verminderte Expression von HIF-1 α wiederum hebt die durch Hypoxie hervorgerufene Vermehrung CD133-positiver TICs auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Antwort auf Hypoxie von TICs eine Aktivierung von HIF-1 α involviert und somit die Differenzierung CD133-positiver TICs inhibiert wird (Soeda *et al.* 2009). In kolorektalen Karzinomen konnte eine erhöhte Expression von CD133 bei einer Mutation von K-Ras und B-Raf, die zu einem hyperaktivierten Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg führt, nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg die CD133-Expression reguliert. Mutationen in einem der beiden Gene gehen dabei mit einer erhöhten CD133-Positivität und mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für die Rekurrenz eines kolorektalen Karzinoms nach Primärtherapie, also einer schlechteren Prognose für den Patienten, einher (Kemper *et al.* 2012).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass CD133 durch Src-Tyrosinkinasen phosphoryliert wird. Dies wurde in Medulloblastom-Zellen nachgewiesen und lässt vermuten, dass die zytoplasmatische Domäne von CD133, die Ziel der Phosphorylierung ist, eine wichtige Rolle in der Regulation der Funktion von CD133 spielt (Boivin *et al.* 2009). Zwei Jahre später konnte anhand von HNO-Tumorzellen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von CD133 durch den Src-

Signalweg zu einer Steigerung der EMT und Expression von Stammzeleigenschaften führt und anders herum durch Inhibierung des Src-Signalwegs der mesenchymale Phänotyp reversibel ist (Chen *et al.* 2011). Auch beim Pankreas-Karzinom war eine EMT, die zur Invasion und Metastasierung des Tumors führt, auf eine Modulation durch CD133 mittels Expression EMT-verwandter Gene zurückzuführen. Dies geschah im Zusammenspiel mit der Expressionssteigerung von N-Cadherin. Außerdem war eine Regulation von CD133 durch ERK1/2 und wiederum den Src-Signalweg nachweisbar (Ding *et al.* 2014). Zusammengefasst kann angenommen werden, dass CD133 bei der Aktivierung der EMT über den Src-Signalweg und ERK1/2 modulierend wirkt.

Interessant ist auch die Betrachtung der Hypoxie-induzierten Signalwege in verschiedenen Tumorentitäten. Stammzellen in Glioblastomen bspw. sind von anormalen vaskulären Nischen in ihrer Mikroumgebung abhängig, welche die normale neurale Stammzellnische vortäuschen (Gilbertson and Rich 2007). Endothelzellen in der perivaskulären Umgebung des Tumors interagieren eng mit den selbsterneuernden Gehirntumorzellen und sekretieren Faktoren, die den Stammzellcharakter der Tumorzellen aufrechterhalten. Daher wird angenommen, dass die TICs in dieser vaskulären Nische organisiert werden (Calabrese *et al.* 2007). Zur Angiogenese im Tumor kommt es durch hypoxieinduzierte Erhöhung von HIF-1 α und HIF-2 α , die eine Steigerung der Expression von CD133 mit erhöhter Selbsterneuerungskapazität in TICs, gezeigt anhand von humanen Gliomzellen, bewirkt. HIF-2 α ist dabei meist mit Tumorstammzellmarkern kolo-kalisiert (Li *et al.* 2009, Soeda *et al.* 2009). Eine andere Studie lieferte genau entgegengesetzte Ergebnisse: durch die Erhöhung von HIF-1 α unter Hypoxie kam es zu einem Abfall der CD133 Expression auf mRNA- und auch auf Proteinebene. Die Inhibition des mTOR-Signalweges, welcher HIF-1 α reguliert, führte zu einem Anstieg der CD133 Expression. Durch das Immunsuppressivum Tacrolimus, ein aus einem Pilz isoliertes Markolid, konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Matsumoto *et al.* 2009). Bei Pankreas-Karzinomzellen, Lungenkarzinomzellen und Nierenkarzinomzellen wiederum, konnte eine gesteigerte HIF-1 α und CD133-Expression unter Hypoxie nachgewiesen werden. Aufgrund dessen zeigten die Zellen ein verstärkt aggressives Wachstum, Migration und Invasionsvermögen (Hashimoto *et al.* 2011, Iida *et al.* 2012, Sun *et al.* 2012). Der P1 Promotor des CD133 Gens zeigte in Lungenkarzinomzellen die

größte durch Hypoxie bedingte Aktivierung, hervorgerufen durch eine direkte Bindung der Transkriptionsfaktoren SOX-2 und OCT-4 an die Promotorregion. Es konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von SOX-2 und OCT-4 für die CD133 Erhöhung notwendig war, da durch Hemmung der beiden Gene die P1 Aktivität gehemmt wurde (Iida *et al.* 2012). Morphologisch zeigt mit TICs angereichertes Tumorgewebe im Vergleich zu Gewebe mit hauptsächlich normalen Tumorzellen verstärkt Nekrosen und Hämorrhagien. Diese Beobachtung resultiert daraus, dass TICs eine gesteigerte Angiogenese induzieren. Dafür sekretieren die TICs VEGF (vascular endothelial growth factor), was durch Hypoxie nochmals verstärkt wird und zu einer erhöhten endothelialen Zellmigration führt. Durch den Einsatz des auch therapeutisch genutzten neutralisierenden anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab konnten diese proangiogenetischen Effekte gehemmt werden (Bao *et al.* 2006). Insgesamt kann gesagt werden, dass eine aktive Beteiligung von CD133 an Hypoxie-vermittelter Neoangiogenese und am Erhalt der Stammzeleigenschaften der Vorläuferzellen möglich ist.

1.2.5 Pathologien durch den Verlust der CD133 Funktion

Das einzig bedeutende Krankheitsbild durch Ausfall des CD133 Gens konnte anhand der autosomal-rezessiven, retinalen Degeneration oder *Retinitis pigmentosa*, gezeigt werden. Die Krankheit führt zu einem progressiven zentralen Visusverlust, da die Funktion von CD133 in den Augenstäbchen essentiell zu sein scheint. Durch eine homozygote Deletion im CD133 Gen kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Translation und das verkürzte CD133 erreicht deshalb die Zellmembran nicht (Maw *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2007, Yang *et al.* 2008). Dadurch kommt es zu einer veränderten Morphologie und progressiven Degeneration der reifen Photorezeptoren im Auge (Zacchigna *et al.* 2009) in denen CD133 normalerweise mit Cadherin und Aktin-Filamenten interagiert (Yang *et al.* 2008). Es wird daher angenommen, dass CD133 wichtig für die neurale retinale Entwicklung ist (Zacchigna *et al.* 2009).

1.2.6 Das Expressionsmuster von CD133 in verschiedenen Zellentitäten

Bei jeglicher Auswertung von Detektionsergebnissen der CD133-Expression, sollte beachtet werden, dass manche Antikörper ein vorhandenes CD133-Protein durch Maskierung mittels Glykosylierung oder Modifikation durch Ganglioside (siehe auch 1.2.3) nicht erkennen und binden können (Taieb *et al.* 2009, Kemper *et al.* 2010a).

1.2.6.1 Die CD133-Expression in gesundem Gewebe

Nachdem man anfangs davon ausgegangen war, dass CD133 ausschließlich von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird (Miraglia *et al.* 1997), konnte im Laufe der Zeit CD133 auch in anderen Geweben detektiert werden. Dies gelang zuerst am einfachsten mit Hilfe von Untersuchungen an der adulten Maus. In der folgenden Tabelle 1.1 sind die verschiedenen murinen Gewebe, in denen CD133 detektiert werden konnte, mit der jeweiligen Referenz aufgelistet.

Tabelle 1.1: CD133 Identifikation in murinem, adultem, gesundem Gewebe.

murines Gewebe	Referenz
Ependym	(Weigmann <i>et al.</i> 1997)
Nierentubuli	(Weigmann <i>et al.</i> 1997)
männlicher Reproduktionstrakt	(Fargeas <i>et al.</i> 2004)
Speichel- und Tränendrüsen	(Jaszai <i>et al.</i> 2007)
Photorezeptoren	(Maw <i>et al.</i> 2000)
Glia	(Corbeil <i>et al.</i> 2009)

Das Expressionsmuster in humanem adultem Gewebe unterscheidet sich etwas vom murinen. Das CD133 Oberflächenprotein konnte nur im Knochenmark (Yin *et al.* 1997) und in dukalen Pankreaszellen (Lardon *et al.* 2008) detektiert werden. Im Kolon und der Niere war es hingegen nicht nachweisbar (Miraglia *et al.* 1997). Unterschieden werden muss deutlich von einem Nachweis der mRNA, die häufiger detektiert werden kann und einem Nachweis des CD133 Oberflächenproteins, da dies wie oben beschrieben, stark von der Verwendung des

Antikörpers abhängig ist. Durch die Verwendung neuer Antikörper, welche CD133 unabhängig vom Glykosylierungsstatus erkennen, konnte das Protein auf der Membran von glandulären Epithelzellen nachgewiesen werden (Florek *et al.* 2005, Karbanova *et al.* 2008).

Die folgende Tabelle 1.2 zeigt eine Auflistung der adulten humanen Gewebe, die CD133 mRNA und/oder das CD133 Protein exprimieren.

Tabelle 1.2: Detektion von CD133 mRNA und AC133-Epitop in humanem, adultem, gesunden Gewebe. Erfolgreicher Nachweis ist durch + gekennzeichnet, kein Nachweis mit - markiert, nicht erfolgter Nachweis durch n.a. (nicht angegeben) beschrieben (Corbeil *et al.* 2001b, Lardon *et al.* 2008).

Gewebe	Detektion von	
	CD133-mRNA	AC133-Epitop
Knochenmark	+	+
Gehirn	+	-
Kolon	+	-
Herz	+	-
Niere	+	-
Leber	+	-
Lunge	+	-
Pankreas	+	-/+
Plazenta	+	-
Skelettmuskulatur	(+)	-
Dünndarm	+	n.a.
Milz	-	n.a.
Hoden	+	-

1.2.6.2 Die CD133-Expression in Stammzellen

Humane embryonale, hämatopoetische und neurale Stammzellen exprimieren ebenfalls CD133, was meist als glykosyliertes AC133-Epitop detektiert werden kann (Kaufman *et al.* 2001, Shablott *et al.* 2001, Levenberg *et al.* 2002). Nach der Differenzierung von Stammzellen ist CD133 herunterreguliert und es konnte

keine Koexpression mit Markern, die für neurodermale, mesodermale oder endodermale Zellen charakteristisch sind, gefunden werden (Kania *et al.* 2005).

Wie schon erwähnt, wurde AC133 anfangs lediglich auf CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus adultem Knochenmark detektiert (Yin *et al.* 1997). Diese AC133 und CD34 positiven Zellen wurden kurze Zeit später auch in der humanen fetalen Leber und im Blut nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass in immundefizienten Mäusen nur diese doppelt positiven Zellen zur Repopulation befähigt waren (de Wynter *et al.* 1998). Gleiche Ergebnisse wurden im Xenotransplantationsmodell mit der ebenfalls CD34⁺ Zelllinie ALDH^{hi}CD133⁺Lin⁻ erzielt (Hess *et al.* 2006). In einer anderen Untersuchung wurde herausgefunden, dass humane AC133⁺ Stammzellen sowohl adhärente als auch nicht-adhärente Zellen generieren können. Die nicht-adhärenenten Zellen können im Folgenden entweder zu hämatopoetischen oder zu endothelialen Zellkolonien differenzieren. Durch Xenotransplantation wurde demonstriert, dass diese AC133-abgeleiteten Zellen neue Blutgefäße *in vivo* bilden konnten, d.h. in endotheliale Zellen differenzieren (Gehling *et al.* 2000). Des Weiteren können *in vitro* CD133⁺/CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen zu neuronalen Zellen, Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren (Uchida *et al.* 2000, Hao *et al.* 2003, Jang *et al.* 2004). Im Vergleich zu CD133⁻ Zellen zeigen CD133⁺ Zellen *in vitro* eine höhere Expression von neuronalen Markern wie bspw. β 3-Tubulin (Padovan *et al.* 2003). Durch Transplantation von isolierten, murinen, CD133⁺ neuronalen Stammzellen in murines Gehirn, zeigte sich, dass die Zellen *in vivo* ebenfalls eine Tripotenz aufweisen, d.h. zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen differenzieren können (Lee *et al.* 2005, Corti *et al.* 2007). CD133 ist jedoch nicht auf allen neuronalen Stammzellen nachweisbar (Pfenninger *et al.* 2007, Sun *et al.* 2009). So exprimieren z.B. neurogene Astrozyten in der adulten subventrikulären Zone des Gehirns kein CD133 an der Zelloberfläche (Pfenninger *et al.* 2007). Außerdem scheint die CD133-Expression auch von der Zellzyklusphase abhängig zu sein, da es während der G0/G1-Phase herunterreguliert ist (Sun *et al.* 2009).

Neuroepitheliale und hämatopoetische Stamm- bzw. Vorläuferzellen setzen CD133-positive Membranpartikel in den Extrazellulärraum frei, wahrscheinlich um die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung zu halten (Dubreuil

et al. 2007, Bauer *et al.* 2011, Ettinger *et al.* 2011). Durch die erhöhte Freisetzung von CD133 zeigen diese Zellen ein erhöhtes Ansprechen auf Differenzierungsstimuli (Ettinger *et al.* 2011). Der einzige Unterschied zwischen hämatopoetischem und neuronalem System ist, dass diese Freisetzung während der hämatopoetischen Zelldifferenzierung Exosomen-vermittelt stattfindet, bei neuronalen Progenitorzellen hingegen durch einen Knospungsmechanismus aus Plasmamembran Protusionen reguliert wird (Bauer *et al.* 2011).

Anhand von basalen Prostatazellen und Prostatakarzinom-Zellen konnte eine kleine Subpopulation von CD133⁺ Zellen (1%) isoliert werden, die epitheliale Stammzeleigenschaften und *in vitro* ein hohes Potential zur Proliferation aufweisen. Diese CD133⁺ Zellen könnten zukünftig ein therapeutisches Angriffsziel darstellen (Richardson *et al.* 2004, Vander Griend *et al.* 2008). Eine andere Untersuchung machte jedoch wiederum deutlich, dass die Expression von CD133 in der Prostata nicht auf basale Stammzellen beschränkt ist, sondern in Tumorgewebe sogar herunterreguliert ist, dafür aber in entzündetem Gewebe verstärkt ist (Missol-Kolka *et al.* 2011).

Die Fähigkeit von CD133⁺ Stammzellen zur Neoangiogenese und Vaskularisierung wurde schon mehrfach beschrieben und könnte in Zukunft auch therapeutisch genutzt werden, um die Tumorversorgung sowie das Wachstum zu verhindern (Peichev *et al.* 2000, Kusumbe *et al.* 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich CD133 als Stammzellmarker in verschiedensten Geweben eignet und für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften einer Zelle, die Regulation der Zelldifferenzierung und die Neovaskularisierung notwendig zu sein scheint. Durch die Detektion von CD133, möglichst auch in Verbindung mit einem anderen Stammzellmarker, können diese Zellen leichter isoliert werden, um sie näher zu erforschen sowie medizinisch bzw. therapeutisch nutzen zu können.

1.2.6.3 Die CD133-Expression in TICs

CD133 alleine oder auch in Kombination mit anderen Markern wird heute für die Identifikation und Anreicherung einer Population von Tumorstammzellen herangezogen. In der folgenden Tabelle 1.3 sind die verschiedenen malignen, humanen Tumorentitäten mit den jeweiligen Referenzen angegeben, in denen CD133⁺ TICs identifiziert werden konnten.

Tabelle 1.3: CD133 Identifikation in humanen soliden Tumoren.

Tumortyp	Referenz
Gehirn	(Singh <i>et al.</i> 2003, Singh <i>et al.</i> 2004b)
Melanom	(Monzani <i>et al.</i> 2007, Quintana <i>et al.</i> 2008)
Sarkom	(Tirino <i>et al.</i> 2008, Tirino <i>et al.</i> 2011)
Prostata	(Collins <i>et al.</i> 2005, Zhou <i>et al.</i> 2011)
Lunge	(Eramo <i>et al.</i> 2008, Tirino <i>et al.</i> 2009)
Kolon	(O'Brien <i>et al.</i> 2007, Ricci-Vitiani <i>et al.</i> 2007, Todaro <i>et al.</i> 2007)
Pankreas	(Olempska <i>et al.</i> 2007)
Leber	(Suetsugu <i>et al.</i> 2006, Yin <i>et al.</i> 2007)
Ovar	(Ferrandina <i>et al.</i> 2008, Baba <i>et al.</i> 2009)

Die CD133⁺ Tumorzellen, die isoliert werden konnten, zeigen meist Eigenschaften von TICs (Tirino *et al.* 2008). Beim Kolonkarzinom bspw. waren in einer Untersuchung 2% der Tumorzellen CD133⁺ (Todaro *et al.* 2007). Da TICs wahrscheinlich für die Tumorentstehung und das Wiederauftreten des Tumors nach einer anfänglichen Ansprecher auf eine Chemotherapie verantwortlich sind, sind sie ein vielversprechendes Ziel für neue Medikamente und zukünftige Therapien (Olempska *et al.* 2007). Wenn diese CD133⁺ Subpopulation aus *in vitro* kultivierten Zelllinien in immundefiziente Mäuse gegeben wurde, konnte sie sowohl das Tumorstadium initiieren als auch aufrechterhalten, Stammzellgene wie OCT3/4, Nanog, SOX-2 und Nestin exprimieren, sowie in mesenchymale Zelllinien differenzieren (Tirino *et al.* 2011). Die Injektion von 10⁴ CD133⁺ Zellen reichte meist aus, um Tumoren zu generieren (Eramo *et al.* 2008). Jedoch nur 0,001-2% der kompletten Tumormasse enthalten Zellen mit Eigenschaften, die im Mausmodell nach Transplantation Tumore induzieren (Collins *et al.* 2005, Todaro *et al.* 2007, Quintana *et al.* 2008). Modifikationen in Xenotransplantationsmodellen konnten jedoch zeigen, dass wahrscheinlich viel mehr Zellen TIC-Potential aufweisen (Quintana *et al.* 2008). Andere Untersuchungen liefern widersprüchliche Ergebnisse: Aus einem Prostata-Karzinom isolierte CD133⁺ und CD133⁻ Zellen zeigten *in vitro* und *in vivo* die gleiche Fähigkeit zur Tumorigenität (Zhou *et al.* 2011). Um die Effizienz der Isolierung von TICs zu erhöhen, sollte eventuell in Betracht gezogen werden, nicht nur mit einem einzigen Marker

zu arbeiten, sondern mit einer Kombination aus mindestens zwei bzw. mehreren. Dies wurde z.B. anhand einer Prostatakarzinom-Zelllinie in Verbindung von CD133 mit CD44 durchgeführt (Collins *et al.* 2005).

1.2.7 Funktionelle Untersuchungen von CD133 in Xenograft-Modellen

Anhand von Mausmodellen kann das Verhalten verschiedener Zelllinien *in vivo* dargestellt werden. Bei einer HCC Zelllinie konnte bspw. eine höhere Tumorigenität und Klonogenität von CD133⁺ im Vergleich zu CD133⁻ Zellen festgestellt werden (Yin *et al.* 2007). Andere Autoren beschreiben bei einer ebenfalls aus einem HCC isolierten Zelllinie bei CD133 Positivität eine Tumorbildung nach subkutaner Injektion in die Maus. Dies war bei CD133⁻ Zellen nicht der Fall oder es bildeten sich allenfalls kleine Tumore (Suetsugu *et al.* 2006). Anhand von stabil mit CD133 transfizierten HEK293 Zellen zeigte sich eine mindestens 1000-fach erhöhte Häufigkeit der Tumorbildung als bei nicht CD133 transfizierten HEK293 Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass CD133 in HEK293 tumor-initiierende Fähigkeiten *in vivo* induziert und potentiell in die Regulation der Tumorigenität involviert ist (Canis *et al.* 2013). Eine andere Untersuchung zeigte hingegen, dass sowohl CD133⁺ als auch CD133⁻ Zellen Tumoren generieren und CD133⁻ Zellen sogar aggressivere Tumoren in der Maus bilden (Shmelkov *et al.* 2008). Auch Beier *et al.* postulierte, dass beide Subtypen eine ähnliche Tumorigenität *in vivo* aufweisen, CD133⁻ Zellen jedoch durch einen geringeren Proliferationsindex auffallen (Beier *et al.* 2007). Da auch CD133⁻ Glioblastomzellen Tumore *in vivo* im Rattengehirn bildeten, wurde behauptet, dass die CD133-Expression für eine Tumorinitiierung nicht notwendig ist, CD133 jedoch in die Tumorprogression involviert ist (Wang *et al.* 2008). Nach Transplantation in immunodefiziente Mäuse zeigte sich, dass ausschließlich die CD133⁺ Stammzelllinie sich im Knochenmark ansiedeln und dieses repopulieren konnte (de Wynter *et al.* 1998, Hess *et al.* 2006). Dies lässt darauf schließen, dass CD133 *in vivo* als alleiniger Marker schwer zu interpretieren ist und das Verhalten der Zellen mitunter von der Zelllinie, vom Individuum und auch vom Gewebetyp abhängig ist.

1.2.8 Die Bedeutung von CD133 als prognostischer und therapeutischer Marker

CD133 Positivität korrelierte bei kolorektalen Karzinomen mit einem schlechteren Überleben über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren (Horst *et al.* 2008, 2009a, Ong *et al.* 2010). Patienten mit einem CD133⁺ kolorektalen Karzinom zeigten zudem auch ein geringeres Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie als Patienten mit CD133⁻ Tumoren (Ong *et al.* 2010). Eine andere Arbeitsgruppe publizierte, dass CD133⁺ Tumoren kein Prädiktor für das Überleben sind, sondern zu einer veränderten Invasivität und Differenzierung des kolorektalen Adenokarzinoms führen (Choi *et al.* 2009).

Bei manchen Tumorentitäten, wie bspw. beim Melanom und beim NSCLC, konnte kein Einfluss von CD133 auf die Prognose des Patienten festgestellt werden (Piras *et al.* 2010, Salnikov *et al.* 2010). Beim NSCLC wurde jedoch festgestellt, dass CD133 in Verbindung mit einem zweiten Marker namens ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2) zu einem höheren Rezidivrisiko führte (Li *et al.* 2011). Bei einem Glioblastom-Rezidiv konnte unerwarteter Weise sogar gezeigt werden, dass eine hohe CD133-Expression mit einem längeren Überleben des Patienten nach Rekurrenz des Tumors einherging (Pallini *et al.* 2011).

CD133 als Surrogatmarker wurde bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen. Dabei korrelierte die CD133-Expression mit einer schlechteren Prognose für den Patienten. In der folgenden Tabelle 1.4 sind die unterschiedlichen Tumoren mit der jeweiligen Referenz angegeben.

Tabelle 1.4: Übersicht der verschiedenen Tumoren mit einer schlechteren Prognose bei CD133-Expression mit Angabe der Referenzen.

Tumorentität	Referenz
Gliom	(Zeppernick <i>et al.</i> 2008)
HCC	(Song <i>et al.</i> 2008)
Kolonkarzinom	(Horst <i>et al.</i> 2008)
Kopf-Hals-Tumoren	(Canis <i>et al.</i> 2012)
Magen-Karzinom	(Ishigami <i>et al.</i> 2010)

Tumorentität	Referenz
Mamma-Karzinom	(Zhao <i>et al.</i> 2011)
Neuroblastom	(Sartelet <i>et al.</i> 2012)
Nierenzellkarzinom	(Kim <i>et al.</i> 2012)
oligodendroglialer Tumor	(Beier <i>et al.</i> 2008)
Pankreas-Karzinom	(Maeda <i>et al.</i> 2008)

CD133 wird mittlerweile auch als Marker in der Krebstherapie eingesetzt. So konnten einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) autolog erfolgreich vorher CD133 selektierte Stammzellen transplantiert werden (Koehl *et al.* 2002). Dies konnte an einem größeren Patientenkollektiv durch allogene Transplantation von CD133⁺ Zellen verschiedener Spender mit Erfolg wiederholt werden (Lang *et al.* 2004). Bei Muskeldystrophien, wie z.B. der Duchenne Muskeldystrophie konnten anhand eines Xenotransplantationsmodells zuvor aus Blut oder Skelettmuskulatur isolierte CD133⁺ Stammzellen die Expression von Dystrophin im Skelettmuskelgewebe wiederherstellen, was einen Kraftanstieg des Muskels nach der Behandlung zeigte (Torrente *et al.* 2004, Meregalli *et al.* 2012). Bei Patienten mit malignen Leberläsionen gelang es bereits effektiv CD133⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark zur hepatischen Regeneration autolog zu transplantieren (Furst *et al.* 2007). Das gleiche war auch zur Myokardregeneration nach Myokardinfarkt erfolgreich und induzierte Angiogenese im verletzten Herzmuskelgewebe (Stamm *et al.* 2003). Auch für die postnatale Vaskulogenese sind diese CD133⁺ Stammzellen von Bedeutung (Asahara and Kawamoto 2004). In der adulten humanen Niere konnten CD133⁺ renale Vorläuferzellen beschädigtes Nierengewebe *in vitro* wiederherstellen (Bussolati *et al.* 2005, Sagrinati *et al.* 2006).

Zusammenfassend kann behauptet werden, dass CD133 einen wichtigen Marker für die Überlebensprognose des Patienten bei einer Krebserkrankung, für die Verbesserung von *targeted therapies* und für die zukünftige Forschung in der regenerativen Medizin darstellt.

1.3 Zielsetzung

Da CD133 in der molekularen Medizin immer weiter an Wichtigkeit gewinnt, jedoch noch wenig über die Signaltransduktionswege sowie Funktionen des Proteins bekannt ist, ist es für weitere wissenschaftliche Erkenntnisse in diesem Bereich wichtig, die mit CD133 verbundenen zellulären Vorgänge genauer zu betrachten. Teils widersprüchliche Forschungsergebnisse in den letzten Jahren stellen einen Anreiz, das Thema weiter zu untersuchen. Die Auswirkungen der CD133-Expression auf verschiedene Zelltypen sind noch wenig erforscht, genauso wie möglicherweise damit verbundene Genregulationen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lagen in der Klärung folgender Fragen:

- Was ist der Einfluss von CD133 auf die Expression zellulärer Gene?
- Wie verändern sich die Proliferation, Morphologie und CD133-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sowie möglicherweise durch CD133 regulierte Gene bei Zellstress wie Hypoxie und Nährstoffentzug?
- Wie verändert sich die Expression von CD133 und möglicherweise durch CD133 regulierter Gene bei der Differenzierung von Tumorzellen?
- Ist das Wachstumsverhalten von CD133⁺ Zellen im Hinblick auf Invasivität und Verankerungsunabhängigkeit *in vitro* zu CD133⁻ Zellen verschieden?

2 Material

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Kits

Artikel	Hersteller
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Agarose Gel (4%)	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Kalifornien (Kemper <i>et al.</i>)
Antikörperversdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG, Hamburg
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BenchMark Proteingrößenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg
Corning® Costar® Stripette	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
ECL Blotting Substrate	Pierce, Bonn
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Glycin	Serva GmbH, Heidelberg
Handschuhe Peha-Soft Latex	Hartmann, Heidenheim

Artikel	Hersteller
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Bedford (Kemper <i>et al.</i>)
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Neomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Oligonukleotide	Metabion, International AG, Planegg
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, KGaA, Darmstadt
PBS Lösung	Apotheke Klinikum Großhadern, Großhadern
PBS-Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pipetboy® Comfort	Integra Biosciences, Fernwald
Probes Mastermix	Roche, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
shRNA	Open Biosystems Dharmacon, Colorado (Kemper <i>et al.</i>)
siRNA	Thermo Scientific Dharmacon, Colorado (Kemper <i>et al.</i>)
Taq-Polymerase, PCR Reagenzien	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Amersham Biosciences, Freiburg
TGFβ-1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	IBA, Göttingen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin

Artikel	Hersteller
Trypsin/ EDTA	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Serva GmbH, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
96-well Zellkulturplatten flach	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Costar, New York (Kemper <i>et al.</i>)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen	BD, Heidelberg
Kryogefäße	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym, Wien (Österreich)
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falcon/BD, Le Pont de Claix (Tirino <i>et al.</i>)
Safe Seal Tips Professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Sterilfilter	Millipore, Wiesbaden
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 1,5 ml (Nuclease-frei)	Costar, New York (Kemper <i>et al.</i>)
Zentrifugengefäße 1,5ml/ 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße 15ml/ 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Amersham, Freiburg
Blotting Kammer	Bio-Rad, Richmond (Kemper <i>et al.</i>)
Durchflusszytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipette „Transferpette“	Brand GmbH, Wertheim
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Richmond (Kemper <i>et al.</i>)
ELISA-Reader EIX800	Bio-Tek Instruments, Winooski (Kemper <i>et al.</i>)
Filmentwicklungskammer	Amersham, Freiburg
Filmentwicklungsmaschine	Optimax, Laborgeräte, Heidelberg
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gel und Western Blot Dokumentation	BioRad, Kalifornien (Kemper <i>et al.</i>)
Glaswaren	Schott AG, Jena
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton (Kemper <i>et al.</i>)
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Carl Zeiss AG, Jena
RoboCycler Gradient 96	Stratagene, La Jolla (Kemper <i>et al.</i>)
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrophotometer „GeneQuantPro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Stickstoff-Kühllagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/ Sieg
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Hersteller
Vortex Mixer	IKA Works Inc., Wirmington (Kemper <i>et al.</i>)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 46 R	Sorvall, Bad Homberg

2.1.4 Dienstleistungen

Tabelle 2.4: In Anspruch genommene Dienstleistungen

Dienstleistung	Dienstleister
Microarray-Genexpressionsanalyse	IMGM Laboratories GmbH (Martinsried)
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
shRNA Synthese	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
siRNA Synthese	Eurogentec, Liège (Belgien)

2.2 Puffer und Stammlösungen

Alle bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Aufbewahrung dieser bei Raumtemperatur (RT).

2.2.1 Zellkultur

Einfriermedium:	10% v/v DMSO; 40% FKS; 50% DEMEM
HEK293 Medium:	DEMEM Medium; 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin
HeLa Medium:	DEMEM Medium; 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin
Fibroblasten Medium	DEMEM Medium; 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin
MDA-MB468 Medium:	DEMEM Medium; 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin

CaCo-2 Medium:	RPMI Medium, 10% FKS; 1% Streptomycin /Penicillin
PBS:	8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g Na ₂ HPO ₄ , 0,2g KH ₂ PO ₄ in 1l H ₂ O

2.2.2 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer:	PBS mit 3% FCS
Propidiumiodid (PI)-Färbelösung:	PBS mit 3% FCS; 1µg/ml Propidiumiodid (PI)
Antikörperlösung:	1:50 in 50µl FACS-Puffer

2.2.3 Western Blot

Lysispuffer:	PBS, 1% Triton X-100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2 Tabletten / 50 ml)
Sammelgel (4%):	30% Acrylamid; 2 M Tris pH=6,8; 0,5 M EDTA
Trenngel (15%):	30% Acrylamid; 2 M Tris pH=8,9, 0,5 M EDTA
Lauf-Puffer:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
Lade-Puffer (Laemmli):	140 mM Tris-HCl pH=7,0, 30% Glycerin, 4% SDS, 16% β-Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau
10x Laufpuffer:	250 mM Tris, 1,26 M Glycerin
Wasch-Puffer (PBST):	PBS mit 0,2 % Tween
Block-Puffer:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer
Primärantikörper-Puffer:	3% BSA in Waschpuffer
Sekundärantikörper-Puffer:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gel:	Agarose in 1xTBE
DNA-Laufpuffer (1x TBE):	45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA
6x Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin
Marker:	Gene Ruler 50 bp DNA-Marker (50 bp - 1 kb), Fermentas

2.3 Antikörper

Primärantikörper (Kat.Nr.)	Hersteller
α -Aktin (sc-1616), Ziege polyklonal	Santa Cruz; Kalifornien (Kemper <i>et al.</i>)
Negativ Kontrolle (X0931); Maus monoklonal IgG1	Dako GmbH, Hamburg
α -EPHA (39005); Kaninchen monoklonal IgG	Cell Signaling; Boston (Kemper <i>et al.</i>)
α -MHCI (2307-1); Kaninchen monoklonal	Epitomics; Burlingame (Kemper <i>et al.</i>)
α -CD133/1 (130090422); Maus IgG1	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
α -CD133/1 (130092395); Maus IgG1 monoklonal	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Isotypkontrolle (M5409); Maus IgG2 monoklonal	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α -Kanamycin Kinase Typ II (AM19000PU-N); Maus IgG2 monoklonal	Acris Antibodies GmbH, Herford
α -CD133 (3663); Kaninchen IgG monoklonal	Cell Signaling; Boston (Kemper <i>et al.</i>)
Sekundärantikörper (Kat.Nr.)	Hersteller
FITC-Kaninchen- α -Ratte (FI-4001)	Vector Laboratories, Burlingame (Kemper <i>et al.</i>)
FITC-Ziege- α -Maus IgG (115095003)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; West Grove (Kemper <i>et al.</i>)
HRP Ziege- α -Maus IgG 39 (P0447)	Dako GmbH, Hamburg

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
FW_CD133	GGACCCATTGGCATTCTC	RT-PCR
BW_CD133	CAGGACACAGCATAGAATAATC	RT-PCR
FW_BACE2	GTGGCAGGAACCCCGCACTC	RT-PCR
BW_BACE2	GGCAAGCCGGCTCCACACAT	RT-PCR
FW_BAI3	GAGGGCTGCCTGACCCAGGA	RT-PCR
BW_BAI3	ATGGGCCGCTGCAGTGTGTC	RT-PCR
FW_CELF2	CGCAGGCCCTGTTCTGCCTC	RT-PCR
BW_CELF2	ATCTCGGGCCAGAGGGGCTG	RT-PCR
FW_CNN2	GGAGGCCGGCTACTGAGGCT	RT-PCR
BW_CNN2	GCAGGGACCCTCGCCCTACA	RT-PCR
FW_DECR1	CTGTGGCCTCGCTCCTCGGA	RT-PCR
BW_DECR1	TCCGGCTGGCTATCACGCAC	RT-PCR
FW_DUSP5	AGATCCTGCCCTCCACGCCC	RT-PCR
BW_DUSP5	GCAGGATGTGGCCGTTGCCA	RT-PCR
FW_FERMT1	TTTGCAGGCGAGTCCGAGGT	RT-PCR
BW_FERMT1	CATCGGGCACAACCTTCGCAGC	RT-PCR
FW_GATA2	GGGACCCTGTCTGCAACGCC	RT-PCR
BW_GATA2	GTGTCCAGCCAGGGCAGCTG	RT-PCR
FW_KLF11	TTGTTGCCCTTGCCCTGC	RT-PCR
BW_KLF11	TCTGCCTGCCAGCCTGGGAT	RT-PCR
FW_RBP7	CCGCCGACCTCAGCGGTACT	RT-PCR
BW_RBP7	TCCAGCCACGAGTCCTCGTCG	RT-PCR
FW_RUNX3	GCTGGAGGCGGGGACCCTAA	RT-PCR
BW_RUNX3	GGTGGGGTGGGGGACACTT	RT-PCR
FW_SHISHA2	ACAATGACCGCCAGCAGGGC	RT-PCR
BW_SHISHA2	GGCGCTGGAGCTGGAAGTGG	RT-PCR
FW_ZNF91	CTTTTGGCCAGAGCAGAGCATGGAA	RT-PCR
BW_ZNF91	AGCAAGGGTTGAAGAACGGCTAAA	RT-PCR
FW_ZNF420	GGGCTGGCGAACCCGAAATTGG	RT-PCR
BW_ZNF420	TCTGAGCAGAGTCCAGGCATTCC	RT-PCR
FW_GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	RT-PCR und qRT-PCR
BW_GAPDH	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	RT-PCR und qRT-PCR
FW_CD133	TGGATGCAGAACTTGACAACG	qRT-PCR
BW_CD133	ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT	qRT-PCR
FW_BACE2	CAGCTGGCGTGCTGGACGAA	qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
BW_BACE2	GGGCTGAATGTAAAGCTGAGGCAGG	qRT-PCR
FW_BAI3	GAATGCCACAGGCACCACTAGCAG	qRT-PCR
BW_BAI3	TCCATCACCTGCCAGCATTGAGC	qRT-PCR
FW_CELF2	CACGAGTCCCGTGGCTGCTTC	qRT-PCR
BW_CELF2	TTCAGAGCCGCCATACCTGAGAGC	qRT-PCR
FW_CNN2	TCCGTCCCCAAGATCAACCGCT	qRT-PCR
BW_CNN2	CTTAGTCTTGGCCTTCCCCGCCAG	qRT-PCR
FW_DUSP5	GCCCGCGGGTCTACTTCCTCAA	qRT-PCR
BW_DUSP5	TTTCAACTGGGCCACCCTGGTCA	qRT-PCR
FW_GATA2	GTCAGTACGGAGAGCATGA	qRT-PCR
BW_GATA2	GGCACATAGGAGGGGTAGGT	qRT-PCR
FW_FERMT1	TGATGCAGCCACCGGGATTCCA	qRT-PCR
BW_FERMT1	CGATGACCACCTGCCGGGTTTC	qRT-PCR
FW_ZNF91	ACTGCTCTGTGTCCTCTGCTCCAG	qRT-PCR
BW_ZNF91	CTGGCATCTTAGCTGTGGCTCTCCA	qRT-PCR
FW_ZNF420	CACCTGCTGGGCTGGCGAAC	qRT-PCR
BW_ZNF420	TCTGGGCTCTTGACAGAGGTGCAG	qRT-PCR
FW_E-Cadherin	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	qRT-PCR
BW_E-Cadherin	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT	qRT-PCR
FW_N-Cadherin	TGGGAATCCGACGAATGG	qRT-PCR
BW_N-Cadherin	TGCAGATCGGACCGGATACT	qRT-PCR
FW_Vimentin	CCTTGAACGCAAAGTGGAAT	qRT-PCR
BW_Vimentin	GACATGCTGTTCTGAATCTGAG	qRT-PCR

2.4.2 siRNA

Zielgen	Sequenz
Kontroll siRNA	5' UCGUCCGUAUCAUUUCAAU 3'
CD133 siRNA	5' UCACAAUCCUGUUAUGACA 3'

2.4.3 shRNA

Zielgen	Sequenz
CD133 shRNA	pSM2c Vektor V2HS_71820

2.5 Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCR 3.1-Uni CD133	Expression von CD133, Kanamycin-/Neomycinresistenz, Ampicillinresistenz
pCR 3.1-Uni	Kanamycin-/Neomycinresistenz, Ampicillinresistenz

Die verwendeten Plasmide waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden.

2.6 Zelllinien

Name der Zelllinie	Herkunft	Beschreibung/Referenz
HEK293	Humane embryonale Niere	(Graham <i>et al.</i> 1977)
HEK293 CD133 ⁻ angereichert	Humane embryonale Niere	Axel Lechner
HEK293 CD133 ⁺ angereichert	Humane embryonale Niere	Axel Lechner
HEK293 Δ transfiziert	Humane embryonale Niere	Transfektanten von pCR 3.1-Uni
HEK293 CD133 transfiziert	Humane embryonale Niere	Transfektanten von pCR 3.1-Uni CD133
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC CCL-2
HeLa Δ transfiziert	Zervix-Karzinom	Transfektanten von pCR 3.1-Uni
HeLa CD133 transfiziert	Zervix-Karzinom	Transfektanten von pCR 3.1-Uni CD133
CaCo-2	Kolorektales Adenokarzinom	ATCC HTB-37
CaCo-2 esiRNA transfiziert	Kolorektales Adenokarzinom	Transfektanten von Kontroll esiRNA
CaCo-2 siRNA transfiziert	Kolorektales Adenokarzinom	Transfektanten von CD133 siRNA
MDA-MB468	Mamma-Adenokarzinom	ATCC HTB-132
MDA-MB468 esiRNA transfiziert	Mamma-Adenokarzinom	Transfektanten von Kontroll esiRNA

Name der Zelllinie	Herkunft	Beschreibung/Referenz
MDA-MB468 siRNA transfiziert	Mamma- Adenokarzinom	Transfektanten von CD133 siRNA
Fibroblasten	Primäre humane Fibroblasten	Andreas Moosmann, Helmholtz Zentrum München
A549	Humanes nicht- kleinzelliges Lungen- karzinom	ATCC CCL-185

ATCC: American Tissue Culture Collection

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellkulturbedingungen

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bzw. RPMI (nur für die Zelllinie CaCo-2) als Standardmedium genutzt. Diesem wurde 10% fötales Kälberserum (FCS) und Antibiotika (1% Streptomycin/Penicillin) zugesetzt. Zur Selektion und Kultivierung stabiler Transfektanten wurde dem Medium Neomycin (1µg/ml) hinzugefügt. Zum Passagieren der Zellen und für alle weiteren Arbeiten in der Zellkultur wurde eine Sicherheitswerkbank unter Verwendung von sterilen Lösungen, Stripetten und Pipettenspitzen benutzt. Adhärenz Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ Partialdruck bei 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Zum Passagieren adhärenz Zellen wurden diese im Durchschnitt alle zwei bis drei Tage gesplittet. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen anschließend kurz mit PBS gewaschen und nach Zugabe von Trypsin (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) für 10-15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen nun in Suspension waren, wurden sie im Verhältnis 1:4 bis 1:10 gesplittet und in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Medium versehen. Falls die Zellen zentrifugiert werden mussten, bspw. um sie zu waschen, wurde dies für 5 Minuten bei 280g und Raumtemperatur durchgeführt.

3.1.1.1 Zellkultur unter Hypoxie (0,1% O₂)

Für den in 4.3.1 gezeigten Zellstress-Versuch wurden die Zellen nach dem Splitten (1 x 10⁴ Zellen pro 10cm Schale) für einen halben Tag konventionell inkubiert. Nach Adhäsion an den Schalenboden und Zugabe von frischem Standardmedium wurden die Zellen für drei, sechs und neun Tage bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator mit 0,1% Sauerstoffgehalt kultiviert.

3.1.1.2 Zellkultur unter verminderter Nährstoffzufuhr (1% FCS)

Auch für den Zellstress-Versuch unter verminderter Nährstoffzufuhr (beschrieben in 4.3.2) wurden die Zellen nach der Subkultivierung (2 x 10⁵ Zellen pro 6-

well) erst vier bis sechs Stunden konventionell inkubiert bis sie am Boden der Zellkulturplatte adhäriert hatten. Anschließend wurde das Standardmedium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und ein anderes Medium verwendet, welchem nur 1% Fötales Kälberserum (FCS) hinzugefügt worden war. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen nun drei bzw. fünf Tage im Standardinkubator kultiviert.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zuerst wie oben bereits beschrieben trypsinisiert und die in Suspension gebrachten Zellen anschließend unter Zugabe von DMEM in ein Falcon Röhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 280g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Bei -80°C wurden die Zellen in einem verschließbaren Styroporbehälter langsam eingefroren und bei längerer Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum möglichst schnellen Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß kurz bei 37°C gelagert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Um das DMSO auszuwaschen wurde nun für 5 Minuten bei 280g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Sodann wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Standardmedium in die Zellkulturflasche überführt. Nach Adhäsion an den Flaschenboden wurden die abgestorbenen Zellen am darauf folgenden Tag durch einen Wechsel des Mediums entfernt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden unter dem Mikroskop durch die Verwendung einer Müller-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,2%) versetzt. Gezählt wurden nur die lebenden Zellen, die den Farbstoff nicht aufnahmen. Die Auswertung der Zählung erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Zählkammer. Für jedes Experiment wurde eine dreimalige Zählung durchgeführt und daraus anschließend der Mittelwert gebildet.

3.1.4 Transfektion und Selektion verschiedener Zelllinien

Sowohl für die Transfektion von CaCo-2 und MDA-MB468 mit siRNA als auch für die Transfektion von HEK293 und HeLa mit einem Expressionsplasmid wurde MATra-A Reagenz verwendet.

3.1.4.1 Transiente Transfektion von Zellen mittels siRNA

Für die Transfektion der Zellen mit csi- bzw. siRNA wurden diese in einer Vertiefung einer 6-well Platte bis zu einer Dichte von 60-80% kultiviert. Nach Entzug des Mediums wurde folgender Reaktionsansatz auf die Zellen gegeben: siRNA bzw. csiRNA, FCS-freies Medium und MATra-A, welcher vorher für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden war. Anschließend wurden die Zellen auf magnetischen Platten für 15 Minuten im Inkubator aufbewahrt, um die Transfektion zu gewährleisten. Später wurde nochmals das Medium gewechselt, um den Reaktionsansatz zu entfernen. Eine zweimalige Transfektion wie gerade beschrieben, fand 72 Stunden nach der Ersttransfektion statt. Dies sollte eine vollständige Transfektion möglichst aller Zellen gewährleisten. 24 Stunden nach der Zweittransfektion wurden schließlich alle Zellen geerntet und die Transfektionseffizienz mit den nun folgenden Methoden ermittelt: Die Expression von Oberflächenproteinen wurde in der Durchflusszytometrie (siehe 3.2), die mRNA-Menge in der RT- bzw. qRT-PCR (3.6.3 und 3.6.4 sowie 3.6.5) und die Proteinmenge im Western Blot (siehe 3.7) bestimmt.

3.1.4.2 Stabile Transfektion von Expressionsplasmiden in Zellen

Auch die Transfektion von Zellen mit einem Plasmid wurde wie in 3.1.4.1 beschrieben mit MATra-A Reagenz durchgeführt. Um stabile Transfektanten zu generieren wurde dem Medium 24 Stunden nach der Transfektion Neomycin hinzugefügt. Dadurch konnten diejenigen Zellen stabil selektiert werden, welche das Plasmid beinhalten und somit die Antibiotikum-Resistenz exprimierten. Überprüft wurde dies regelmäßig durch Western Blots, Durchflusszytometrie und RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Durch diese Verfahren konnte die Expression des transfizierten CD133-Expressionsplasmids in der Zelllinie nachgewiesen werden.

3.1.5 Generierung von Zelllysaten

Um Gesamtzelllysate für Western Blots herzustellen, wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die Suspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 280g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 13000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die unlösliche Fraktion zu entfernen sowie den Proteine-enthaltenden Überstand in ein neues Gefäß zu überführen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Kit (siehe 3.7.1). Anschließend wurde das Lysat in Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht.

3.2 Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Oberflächenexpression von Proteinen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) vermessen. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS, Trypsinieren und Ernten bei 4°C sowie 280g für 5 Minuten im Falcon Röhrchen zentrifugiert. Das nun entstandene Zellpellet wurde nochmals mit PBS gewaschen und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert. Der einen Hälfte der Zellen wurde nun ein Primärantikörper in einer 1:50 Verdünnung hinzugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde erneut für 3 Minuten bei 4°C sowie 280g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den in FACS-Puffer gelösten FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (FITC= Fluorescein Isothiocyanat) erhielten alle Proben (50µl FACS-Puffer + 1µl Sekundärantikörper). Damit sollte als Negativkontrolle eine Bindung des Sekundärantikörpers bei den nur mit einem Antikörper behandelten Zellen ausgeschlossen werden. Inkubiert wurde dieser zweite Antikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 3 Minuten bei 4°C sowie 280g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer und Zentrifugieren wurde das Zellpellet in FACS-Puffer und 0,5% Propidiumiodid (PI) resuspendiert. Durch das PI wurden bereits tote Zellen, die den Farbstoff im Gegensatz zu noch lebenden Zellen aufnehmen, durchflusszytometrisch detektiert und aus der Auswertung ausgeschlossen. Nun konnte im Durchflusszytometer die Oberflächenexpression der

Antikörper-markierten Proteine gemessen werden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Expression des untersuchten Oberflächenproteins. Die Messdaten wurden jedes Mal durch Division mit der Negativkontrolle normalisiert. Bei stabilen Transfektanten wurden Kontroll-Transfektanten, welche nur den Leervektor beinhalten, als weitere Negativkontrolle vermessen. Die anschließende Analyse der vermessenen Daten erfolgte mittels der Software Cell Quest Pro.

3.3 TGFβ Assay

Für den TGFβ Versuch wurden die Zellen in 6-well Zellkulturplatten ausplattiert (1×10^5 Zellen pro 6-well für das 48 Stunden Experiment und $0,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well für das 72 Stunden Experiment). 24 Stunden später wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Das Medium enthielt ab diesem Zeitpunkt kein FCS, damit ein eventueller Effekt nicht auf das Fötale Kälberserum zurückzuführen war. Nun wurde der Hälfte der Zellen TGFβ-1 (10ng/ml) zugegeben und anschließend für 48 und 72 Stunden kultiviert. Schließlich wurden unter dem Mikroskop Fotos von den TGFβ behandelten Zellen und der Negativkontrolle gemacht. Die geernteten Zellen wurden sowohl mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD133 untersucht, als auch mittels Real time quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) die mRNA-Menge von CD133, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin bestimmt.

3.4 Colony Formation Assay

Durch einen Colony Formation Assay mit Agarose Gel (4%) kann *in vitro* das verankerungsunabhängige Wachstum von verschiedenen Kolonie-bildenden Zelllinien quantifiziert werden. Zu Beginn wurden 24-well Platten mit zwei unterschiedlich dichten Agarschichten hergestellt. Die Agarschicht am Boden wurde aus einer 1,4% Lösung hergestellt. Dafür wurden 14ml 4% Agarose Gel und 26ml Aqua dest. steril aufgekocht und bei 50°C im Wasserbad bereit gestellt. Diese Lösung wurde anschließend mit auf 37°C vorgewärmten Standardmedium (10% FCS und 1% Streptomycin/Penicillin enthaltend) 1:1 verdünnt und 300µl pro 24-well pipettiert. Während diese untere Agarschicht fest wurde, wur-

den die trypsinisierten Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und gezählt. Wie in 4.5 beschrieben, wurden je nach Zelllinie 1000, 2000 bzw. 5000 Zellen pro 24-well verwendet. Die obere Agarschicht bestand aus einer 0,6%igen Lösung, die aus 6ml 4% Agarose Gel und 34ml Aqua dest. durch steriles Aufkochen hergestellt und bei 50°C im Wasserbad homogen temperiert wurde. Auch diese Lösung wurde mit bei 37°C vorgewärmten Medium 1:1 vermischt. Als die Gesamtlösung eine Temperatur von 37°C oder weniger hatte, wurden die ausgezählten Zellen hinzugefügt und als zweite Schicht in die 24-wells gegeben (200µl pro well). Nachdem die obere Agarschicht ebenfalls fest geworden war, wurden die Platten für insgesamt 10 Tage kultiviert bis die gebildeten Kolonien unter dem Mikroskop fotografiert und anschließend am Bildschirm ausgezählt wurden. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen regelmäßig, d.h. alle 3-4 Tage mit einer frischen, 1:1 Medium und Agar-Lösung enthaltenden Gesamtlösung versorgt. Dabei wurden 100µl pro 24-well pipettiert.

3.5 Sphäroid Modell

3.5.1 Bildung von Sphäroiden

Für die Bildung von Sphäroiden wurden zuerst 96-well Platten mit 100µl 1% Agarose in PBS beschichtet. Zum Aushärten der Agarose wurden die 96-well Platten in Parafilm eingewickelt und für zwei Stunden bei 4°C gekühlt. Anschließend wurden je 96-well verschiedene Zellzahlen plattiert. Dabei hat sich eine Zellzahl von 30000 pro Vertiefung für die Sphäroid-Bildung und das weitere Vorgehen als geeignet herausgestellt. Für dieses Experiment wurden die Zelllinien HEK293 CD133⁻ angereichert und CD133⁺ angereichert verwendet. Die Inkubation mit Bildung und Wachstum der Sphäroide erfolgte unter diesen Bedingungen für 24 bis 72 Stunden. Anschließend wurden die Sphäroide unter dem Mikroskop fotografiert.

3.5.2 Invasion von Fibroblasten-Sphäroiden

Für die Invasion von Fibroblasten-Sphäroiden durch ein HEK293-Sphäroid wurden, nachdem 96-well Platten mit 100µl 1% Agarose in PBS beschichtet wor-

den waren, 30000 Fibroblasten pro 96-well ausplattiert und für 24 Stunden inkubiert. Nun wurde je ein Fibroblasten-Sphäroid und ein HEK293 CD133⁺ bzw. ⁺angereichert Sphäroid pro 96-well zusammenpipettiert und die Invasion der HEK293 Zellen in das Fibroblasten-Sphäroid für 48 bis 72 Stunden zugelassen. Anschließend wurden die Sphäroide wieder unter dem Mikroskop fotografiert.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Isolation von RNA und Synthese von cDNA

Für die Präparation von RNA aus den verschiedenen Zelllinien wurde das RNeasy Mini Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nachdem die trypsinierten Zellen geerntet und mit PBS gewaschen worden waren, wurde die RNA mit Hilfe eines Puffers in einer QiaShredder Säule (Quiagen) isoliert.

Die Umschreibung von RNA zu komplementärer DNA (cDNA) wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) durchgeführt. Zuerst wurden stets mögliche genomische DNA-Reste mittels *gDNA Wipeout Buffer* verdaut. Dafür wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 14µl bestehend aus 2µl des Puffers und 1µg der Template RNA für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Effizienz dieser Reaktion wurde in der anschließenden RT-PCR/qRT-PCR jedes Mal durch ein Template RNA, das mit *gDNA Wipeout Buffer* behandelt worden war, gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) überprüft. Da dieses Template RNA nach Verdauung möglicher genomischer DNA-Reste nicht zu cDNA umgeschrieben worden war, durfte bei diesem Kontrollansatz keine Reaktion messbar sein. Im zweiten Schritt wurde mittels Reverser Transkriptase die einsträngige RNA in cDNA umgeschrieben. Die durch die Reverse Transkriptase hervorgerufene Reaktion wurde nach 30 Minuten bei 42°C durch ein Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95°C für 3 Minuten gestoppt. Für jede Probe wurde stets 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Jegliche Arbeitsschritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers auf Eis vorgenommen.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Das Spektrophotometer GeneQuantPro wurde jedes Mal zuerst mithilfe einer mit Tris befüllten Mehrfachküvette geeicht. Anschließend wurde die RNA-Konzentration der Probe bestimmt und die benötigte Menge für 1µg RNA errechnet.

3.6.3 Standard Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die Amplifikation der cDNA wurde stets das Enzym Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) verwendet. Das richtige Temperaturprofil je nach Schmelzkurve der verschiedenen verwendeten Oligonukleotide und die richtige Anzahl an Zyklen wurden in Vorversuchen mittels PCR ausgetestet. Im Folgenden sind der Reaktionsansatz und das Programm für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dargestellt. Das Produkt der Amplifikation wurde anschließend jedes Mal mittels Agarose Gelelektrophorese visualisiert und quantifiziert.

Reaktionsansatz RT-PCR	
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>
10x Taq Puffer mit KCl	2µl
dNTP (25 mM)	2µl
MgCl ₂ (25 mM)	2µl
Taq-Polymerase	1µl
Primer forward (10µM)	1µl
Primer backward (10µM)	1µl
cDNA	1-5µl
Mit H ₂ O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt	

Programm für die RT-PCR			
<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Reaktion</i>
95°C	10 min	1	Denaturierung
95°C	30 sec	1	Denaturierung
57-63°C	30 sec	23-35	Annealing
72°C	30 sec		Elongation
72°C	10 min		Elongation
4°C	∞	1	Kühlung

3.6.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Amplikons der RT-PCR konnten nun mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dafür wurden je nach Größe der Nukleinsäuren Agarosegele verschiedener Konzentration (2-3%) gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer). Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) in das Gel, welches in die cDNA interkaliert, konnten in einem zweiten Schritt unter dem UV-Licht die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht und mit Hilfe des Programmes Image Lab Software (Biorad) quantifiziert werden.

3.6.5 Real time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Real Time quantitative PCR (qRT-PCR) stellt eine Weiterentwicklung der Standard PCR (RT-PCR) dar und liefert exaktere Ergebnisse zur Quantifizierung der RNA. Für diese Methode wurde ebenfalls die in 3.6.1 synthetisierte cDNA und außerdem das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Der Farbstoff SYBR Green I interkaliert während der Reaktion in die cDNA. Damit kann danach von dem Gerät die Fluoreszenz jeder einzelnen Probe quantifiziert werden.

Die Messungen wurden mit dem Lightcycler 480 (Roche) durchgeführt und anschließend mit dem Programm LightCycler 480 SW 1.5 (Roche) analysiert. Durch eine Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der vom Gerät errechneten Signale nachgewiesen werden.

Es wurde jedes Mal ein Reaktionsansatz hergestellt, dessen Menge je nach Anzahl der Matrizen und Primer differierte. Dabei wurde jede Probe dreifach gemessen und daraus später Mittelwerte gebildet.

Die folgende Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde verwendet:

Reaktionsansatz qRT-PCR	
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>
SYBR Green I Master-Mix	5µl
Primer forward (10µM)	1µl
Primer backward (10µM)	1µl
cDNA	1µl
H ₂ O	2µl
	Σ 10µl

Das Programm für die qRT-PCR ist im Folgenden zusammengefasst:

Programm für die qRT-PCR			
<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Reaktion</i>
95°C	10 min	1	Denaturierung
95°C	30 sec	45	Amplifikation
72°C	60 sec		
95°C	30 sec		
4°C	∞	1	Kühlung

3.7 Western Blot

Um die Proteinmenge aus Zelllysaten quantifizieren zu können, wurde die Methode des Western Blot angewendet.

3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer Probe aus generierten Zelllysaten (siehe 3.1.5) wurde mit Hilfe des BCA-Kits nach Angaben des Herstellers ermittelt. Dabei wurde die Proteinprobe 1:100 mit der BCA-Lösung vermischt und anschließend

im Spektrophotometer GeneQuantPro vermessen. Jegliche Messung wurde doppelt vorgenommen und als Referenz wurde eine Probe, die ausschließlich Bovines Serum Albumin (BSA) enthielt, vermessen. Um eine Hintergrundmessung, die die Werte verfälschen könnte, auszuschließen, wurden außerdem auch Proben gemessen, die ausschließlich BCA enthielten. Diese Werte wurden anschließend vom Messwert jeder Probe subtrahiert.

3.7.2 SDS-Polyacrylamidgele

Um die Proteine mittels Western Blot visualisieren und quantifizieren zu können, wurde das Zelllysate zuerst mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Durch das Anlegen einer Spannung werden die verschiedenen Proteine der Größe nach aufgeteilt, wobei kleinere Proteine die Polyacrylamidmatrix schneller durchlaufen als größere. Es wurden zwei verschiedene Gele gegossen: ein Sammelgel (4%) mit neutralem pH-Wert, das die Proteine am Anfang der Reaktion zwischen den beiden Gelen konzentriert und ein Trenngel (15%), in welchem die Proteine dann aufgetrennt werden.

Die Zelllysate (Gesamtproteinmenge 25-50 µg) wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht (Laemmli 1970). Nun wurden die Proteine in vorher festgelegten Konzentrationen auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend unter definierten Laufbedingungen (Fokussierung: 15 min bei 15mA/Gel, 180V; Auftrennung: 30mA/Gel, 180V) aufgetrennt. Als Standard wurde bei jedem Gel der Proteingrößenstandard BenchMark (Invitrogen) mit aufgetragen. Danach konnte das Gel für den Western Blot verwendet werden.

3.7.3 Western Blot

Die Proteine wurden vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine durch Methanol aktivierte Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (100V, max. 500mA, 50 min). Anschließend wurde die Membran wiederum in Methanol geschwenkt, um die Proteine zu fixieren und den Färbegrund zu vermindern. Nach dem Trocknen wurde für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einem Blockpuffer inkubiert. Damit konnten unspezifische Bindungen des

Antikörpers an die Membran vermieden werden. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBST wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper (1:10000 in Primärantikörper-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde drei Mal mit PBST gewaschen und die Membran dann mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (1:5000 in Block-Puffer) für 30-90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wie nach der Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran wieder mindestens dreimal mit dem Wasch-Puffer PBST für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Proteine wurden durch die Peroxidasereaktion in einem ChemiDoc-Gerät mittels CCD-Kamera detektiert. Dafür wurde entweder das Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) oder das ECL Blotting Substrate (Pierce) verwendet. Die semi-quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Image Lab Software (Biorad). Dabei wurden die gemessenen Hintergrundintensitäten stets vom Ergebnis subtrahiert.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von CD133 auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien

Die Höhe der Expression des Tumormarkers CD133 kann auf verschiedenen zellulären Ebenen nachgewiesen werden, so bspw. die Menge des Proteins auf der Zellmembran oder in der gesamten Zelle, sowie die relative Expression auf mRNA Niveau. Je nach Zelllinie und Entwicklungszustand einer Zelle, kann sich viel CD133 an der Zelloberfläche befinden, jedoch kaum für CD133 kodierende mRNA innerhalb der Zelle oder auch anders herum. In einem zweiten Schritt können je nach gemessenen Ergebnissen Rückschlüsse auf Stoffwechselprozesse sowie Umwelteinflüsse, welche die CD133-Expression beeinflussen, gezogen werden. Um die Effizienz der Doppeltransfektion mit CD133 siRNA und einer Kontroll-siRNA bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 beziehungsweise die Sortierung von HEK293 CD133⁻ angereicherten und CD133⁺ angereicherten Zellen zu überprüfen, wurden zunächst Western Blots mit kommerziellen Antikörpern durchgeführt. Dadurch konnte die Expression von CD133 auf Proteinebene untersucht werden. Um die aufgetragene Proteinmenge quantifizieren zu können, wurde die Intensität mit dem Kontroll-Antikörper Aktin verrechnet.

4.1.1 Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie CaCo-2 csi/siRNA transfiziert

Die etablierte Zelllinie CaCo-2 stammt ursprünglich aus einem menschlichen epithelialen Kolon-Adenokarzinom und exprimiert endogenes CD133. Für die folgenden Experimente wurden die Zellen zweimalig mit einer CD133 siRNA transfiziert, um durch RNA-Interferenz die Expression des CD133 Proteins zu unterdrücken. Als Kontrolle diente eine csiRNA, die keine Zielsequenz in den Zellen hat.

In Abbildung 4.1 ist gut zu erkennen, dass die relative Intensität für Aktin sowohl bei den CD133 siRNA als auch bei den Kontroll-siRNA transfizierten CaCo-2 Zellen identisch ist. Die Menge der CD133 Proteinmenge zeigt bei den CD133 siRNA transfizierten CaCo-2 Zellen jedoch eine erhebliche Reduktion.



Abbildung 4.1: Nachweis der Effizienz der CD133-Unterdrückung bei der Zelllinie CaCo-2 im Western Blot. Als Kontrolle diente das ubiquitär vorkommende Protein Aktin. Die Intensitätsmessung von CD133 wurde auf die Aktinintensität normiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

Nach Messung der relativen Intensität der Banden konnte die Quantität der CD133-Proteinexpression in einem zweiten Schnitt berechnet werden. Die folgende Abbildung 4.2 zeigt graphisch die relative Intensität von CD133 bei der Zelllinie CaCo-2 im Western Blot.

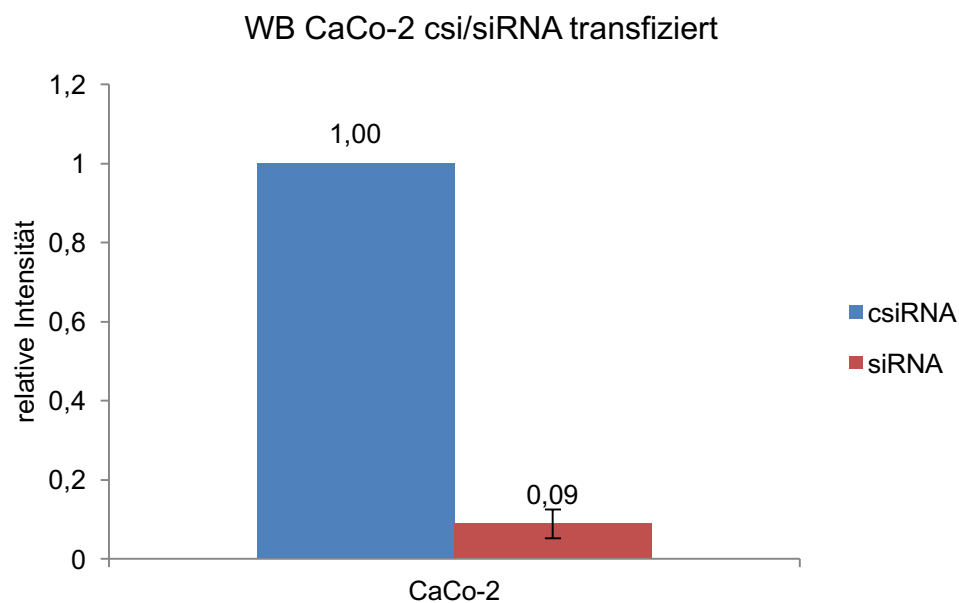


Abbildung 4.2: Graphische Darstellung der relativen Intensität von CD133 bei der Zelllinie CaCo-2 im Western Blot. Der prozentuale Anteil wurde durch Normalisierung mit der Kontrolle (Kontroll-siRNA/Kontroll-Plasmid (Δ) = 100 %) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach Doppeltransfektion der Zelllinie CaCo-2 mit CD133 siRNA konnte gezeigt werden, dass CD133 auf Proteinebene auf 9% des Ausgangsniveaus gesenkt wurde. Da die csiRNA keine Ziel-mRNA in der Zelle besitzt, blieb auch nach zweimaliger Transfektion die Höhe der CD133-Expression bei dieser Subpopulation identisch und ist in der Abbildung 4.2 mit 1,00 angegeben.

4.1.2 Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert

Die seit 1977 für Forschungszwecke genutzte Mamma-Adenokarzinom Zelllinie MDA-MB468 wurde mit den gleichen CD133 siRNA und csiRNA, wie sie auch für CaCo-2 verwendet wurden, zwei Mal transfiziert und anschließend die Menge des CD133 Proteins im Western Blot detektiert. Abbildung 4.3 zeigt zum einen eine fast identische Aktin Proteinmenge bei beiden Subpopulationen der MDA-MB468 Zellen. Zum anderen zeigt sich nach der Doppeltransfektion mit CD133 siRNA eine deutliche Reduktion der Bandenintensität für CD133 im Vergleich zu den csiRNA transfizierten MDA-MB468. Die Differenz der Intensität für Aktin wurde für die Auswertung der CD133 Proteinmenge beider MDA-MB468 Zellpopulationen verrechnet.



Abbildung 4.3: Proteinmenge von CD133 nach zweimaliger Transfektion der Zelllinie MDA-MB468 mit CD133 siRNA. Als Kontrolle diente das ubiquitär vorkommende Protein Aktin. Dies ist das repräsentative Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

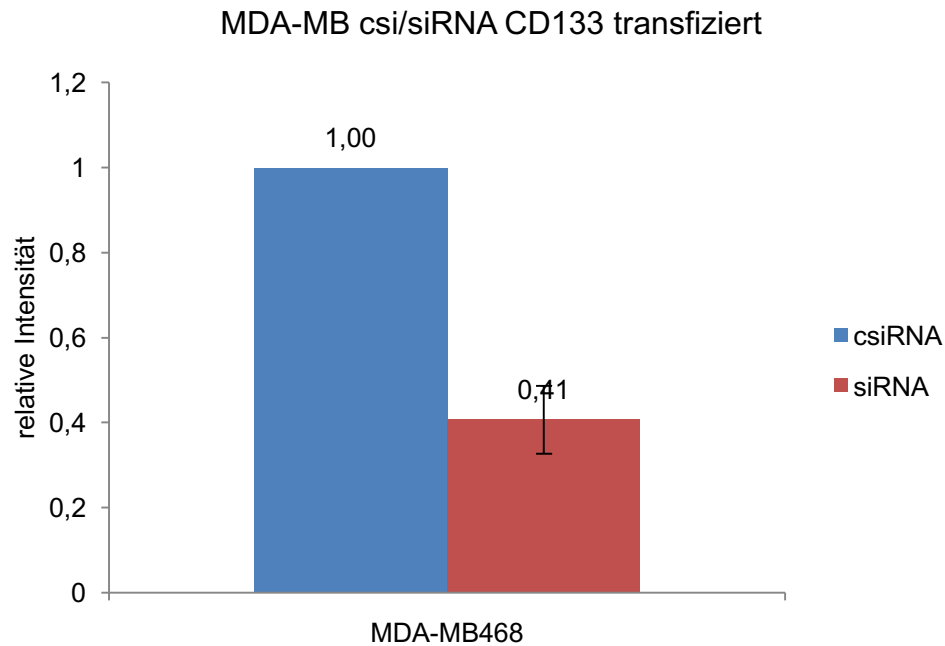


Abbildung 4.4: Graphische Darstellung der relativen Intensität von CD133 bei der Zelllinie MDA-MB468 im Western Blot. Der prozentuale Anteil wurde durch Normalisierung mit der Kontrolle (Kontroll-siRNA/Kontroll-Plasmid (Δ) = 100 %) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Erneut wurde, wie Abbildung 4.4 zeigt, durch Messung der relativen Intensität der aufgetragenen Proteinmengen die Menge von CD133 auf Proteinebene quantifiziert. Für die Kontroll siRNA doppeltransfizierte Subpopulation der Zelllinie MDA-MB468 gilt wiederum, dass die csiRNA keine Zielsequenz in den Zellen hat und sich deshalb wegen fehlender Interaktion in der Zelle verglichen mit untransfizierten Zellen keine Änderungen für die Expression von CD133 auf Proteinebene ergeben. Somit wird der Wert der CD133 Proteinmenge in der Grafik mit dem Wert 1,00 angezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der mit CD133 siRNA doppeltransfizierten Subpopulation der MDA-MB468 Zelllinie zu einer Unterdrückung der CD133-Expression von 59% kam.

4.1.3 Expression von CD133 auf Proteinebene bei der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 exprimiert kein endogenes CD133 und wurde zuvor in unserem Labor durch Dr. Axel Lechner stabil mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert. Durchflusszytometrisch konnte

gezeigt werden, dass die CD133-Expression der HEK293 Transfektanten einen zweigipfligen Verlauf hatte. Es gab dabei eine Zellpopulation, die CD133 stark exprimierte und eine andere, die nur schwach positiv für CD133 war. Deshalb wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie nach CD133⁻ bzw. ⁺ angereichert und mit Neomycin enthaltendem Selektionsmedium in Kultur gehalten. Mittels Western Blot konnte nun die CD133-Expression, beziehungsweise das Fehlen von CD133 bei den HEK293 CD133⁻ angereicherten Zellen nachgewiesen werden. Dies wird in der folgenden Abbildung 4.5 veranschaulicht.

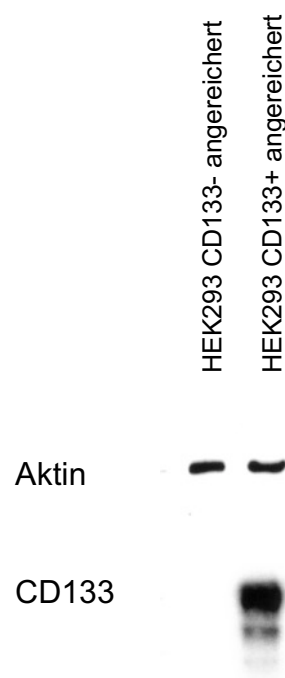


Abbildung 4.5: CD133-Expression in HEK293 CD133^{-/+} angereicherten Zellen im Western Blot. Zu sehen ist der Nachweis der CD133-Proteinmenge bei HEK293 CD133⁺ angereicherten bzw. das Fehlen von CD133 bei HEK293 CD133⁻ angereicherten Zellen. Als Kontrolle diente das ubiquitär vorkommende Protein Aktin.

4.2 Die Auswirkung der CD133-Expression auf die Genregulation

Mittels eines cDNA-Microarrays waren die Zelllinien HEK293 CD133⁻ und CD133⁺ angereicherten Zellen in unserem Labor auf die Zusammensetzung des Transkriptoms untersucht worden. Die Genexpressionsanalyse wurde von einem externen Labor in Martinsried (IMGM Laboratories GmbH) durchgeführt. Die Auswertung dieser Genomanalyse zeigte, dass einige potentielle Zielgene

von CD133 in den CD133⁺ angereicherten Zellen im Vergleich zu den CD133⁻ angereicherten Zellen herauf- oder herunterreguliert waren. In der folgenden Tabelle 4.1 wird nun eine Auswahl der Ergebnisse gezeigt.

Tabelle 4.1: Potentielle Zielgene von CD133 in HEK293 CD133⁺ angereicherten versus CD133⁻ angereicherten Zellen unter Angabe der jeweiligen Regulation, der chromosomalen Lokalisation und Funktion des entsprechenden Gens.

Gen	Regulation	Lokalisation	Funktion
<i>Heraufregulation</i>			
CELF2	x 116,34 ↑	10p14	Neuroblastom Apoptose-verwandtes RNA-bindendes Protein
BACE2	x 47,15 ↑	21q22.3	Amyloid β sekretierendes Protein, Alzheimer-assoziiert
RBP7	x 44,15 ↑	1p36.22	zelluläres Retinol-bindendes Protein
CNN2	x 4,89 ↑	19p13.3	Aktin-bindendes Protein in der glatten Muskulatur
ZNF420	x 2,00 ↑	19q13.12	p53-assoziiertes Zinkfinger-Protein
FERMT1	x 4,29 ↑	20p12.3	trägt zur Integrin-Aktivierung bei, an der Zelladhäsion beteiligt
DUSP5	x 3,26 ↑	10q25.2	Phosphatase, inaktiviert Ziel-Kinasen
GATA2	x 2,24 ↑	3q21.3	endothelialer Transkriptionsfaktor
ZNF91	x 2,34 ↑	19p12	Zinkfinger-Protein der KRAB-Subfamilie
<i>Herunterregulation</i>			
DECR1	x 44,36 ↓	8q21.3	mitochondriale Reduktase, Hilfsenzym der β-Oxidation
RUNX3	x 8,73 ↓	1p36.11	Transkriptionsfaktor, Tumor-Suppressor
KLF11	x 2,08 ↓	2p25.1	Transkriptionsfaktor, induziert Apoptose
BAI3	x 2,07 ↓	6q13	Gehirn-spezifischer Angiogenese-Inhibitor
SHISA2	x 2,40 ↓	13q12.13	Transmembran-Protein, Reifungsprozess mesodermaler Zellen wird beeinflusst

4.2.1 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mittels RT-PCR

Als Vorversuche wurden zuerst verschiedene Primer für die oben genannten Gene (siehe Tabelle 4.1) auf Funktionalität getestet und dann mit Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktionen durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch quantifiziert. Dies sollte dazu dienen, herauszufinden, wie sich die Genexpression potentieller Zielgene von CD133 in unterschiedlichen Zelltypen abhängig von der

Höhe der CD133-Expression verhält. Dabei wurden sowohl stark als auch schwach CD133-positive Zelllinien, CD133-negative und CD133-positive Zelllinien verwendet. Als Kontrolle diente bei allen Versuchen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), ein ubiquitär vorkommendes Gen, im Englischen „housekeeping gene“. Auf dessen relative Expression wurden die Werte der restlichen Gene in jedem Experiment jeweils unabhängig normiert.

4.2.1.1 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in den Zelllinien HEK293 CD133^{-/+} angereichert mittels RT-PCR

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Microarrays überprüfen zu können, wurde mit der mRNA der gleichen Zelllinie, zum einen der HEK293 CD133⁻ angereicherten Subpopulation und zum anderen der HEK293 CD133⁺ angereicherten Subpopulation, eine RT-PCR und anschließende Gelelektrophorese für CD133 und die potentiellen Zielgene durchgeführt. Abbildung 4.6 zeigt die Auswertung des Experiments, wobei die grün unterlegten Zahlen eine Übereinstimmung der Herauf- bzw. Herunterregulation der mRNA von CD133 und den Zielgenen in der HEK293 CD133⁺ angereicherten Subpopulation mit den Microarray-Daten darstellen. Die mRNA der HEK293 CD133⁻ Subpopulation diente dabei als Referenz für die Auswertung der Ergebnisse, d.h. die Regulation jedes einzelnen Zielgens wurde für die HEK293 CD133⁺ Subpopulation jeweils auf den Wert der HEK293 CD133⁻ Subpopulation normiert.

Die relative Expression der CD133 mRNA ist bei den ⁺ angereicherten HEK293 Zellen doppelt so hoch wie bei den CD133⁻ angereicherten. Im Gegensatz dazu zeigte die Auswertung der Proteinexpression mittels Western Blot in Abschnitt 4.1.3 ein komplettes Fehlen von CD133 bei der HEK293 CD133⁻ angereicherten Subpopulation (Abbildung 4.5). Die extrem hohe relative Expression von CELF2 mit einem Wert von 4195520 ist zurückzuführen auf eine Überbelichtung der Bande aus der Gelelektrophorese unter dem UV-Licht und ist nur eingeschränkt verwertbar. Aus Gründen der übersichtlichen Darstellung für die anderen Zielgene reicht er über die Diagrammdarstellung hinaus. Die mRNA des Gens RUNX3 konnte bei dieser Zelllinie nicht detektiert werden. SHISA2 zeigte eine inverse Regulation zu den Microarray Ergebnissen. Die restlichen potentiellen Zielgene zeigen alle eine gleichsinnige Regulation wie in der Auswertung des Microarrays für diese Zelllinie.

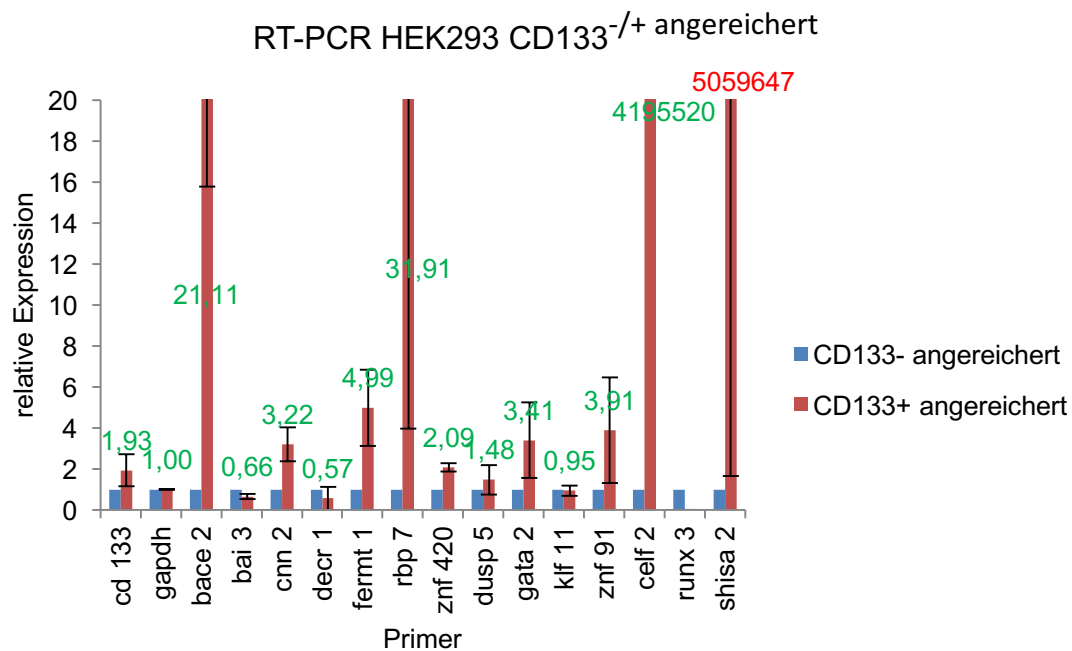


Abbildung 4.6: Auswertung von drei unabhängigen RT-PCRs der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert für CD133 und potentielle Zielgene. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Grün unterlegte Zahlen veranschaulichen die Übereinstimmung der Genregulation mit den Microarray-Daten.

4.2.1.2 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in den Zelllinien HEK293 Δ /CD133 mittels RT-PCR

HEK293 Wildtyp Zellen wurden mit einem CD133-Expressionsplasmid und einem Leerplasmid (Δ), welches nur eine Neomycin-Resistenz exprimiert, transfiziert und stabil unter einem Neomycin enthaltenden Selektionsmedium in Kultur gehalten. Diese beiden Subpopulationen der endogen CD133-negativen Zelllinie HEK293 wurden generiert, um im nun folgenden Experiment beurteilen zu können, ob es einen Unterschied in der Genregulation der potentiellen Zielgene von CD133 zwischen HEK293 Zellen gibt, die mit einem Leerplasmid transfiziert worden waren und HEK293 Zellen, die zwar mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden waren, jedoch keine oder kaum eine CD133-Expression aufwiesen (HEK293 CD133⁻ angereichert). Außerdem war die Frage interessant, ob die HEK293 CD133 transfizierte Subpopulation in der Regulation der potentiellen Zielgene mit der HEK293 CD133⁺ angereicherten Subpopulation (siehe Abschnitt 4.2.1.1) differiert bzw. übereinstimmt. Die Ergebnisse konnten zum einen mit den Microarray-Daten von HEK293 CD133^{-/+} angereichert

und zum anderen mit der RT-PCR dieser Zelllinie verglichen werden. Wie in der folgenden Graphik (Abbildung 4.7) sichtbar, zeigten die HEK293 Δ transfizierten Zellen wie erwartet keine CD133-Expression, die HEK293 CD133-Expressionsplasmid transfizierte Subpopulation eine extrem starke relative Expression von CD133 mit einem Wert von 5668812. Die gezeigten Werte wurden mit Hilfe des Programmes Image Lab Software (Biorad) quantifiziert (siehe 3.6.4). Dadurch konnte die erfolgreiche Transfektion der beiden Subpopulationen mit dem CD133-Expressionsplasmid bzw. Leerplasmid nachgewiesen werden. Außerdem konnte die effiziente Transfektion der HEK293 Zellen mit dem jeweiligen Plasmid durch den Nachweis der mRNA für das Neomycin Resistenz-Gen (*neo r*), welches sich auf beiden Plasmiden befindet, dargestellt werden. Normiert wurden die Ergebnisse der beiden Subpopulationen für jedes unabhängige Experiment auf die GAPDH-Expression, um eine Vergleichbarkeit der Expressionshöhe für jedes Gen gewährleisten zu können.

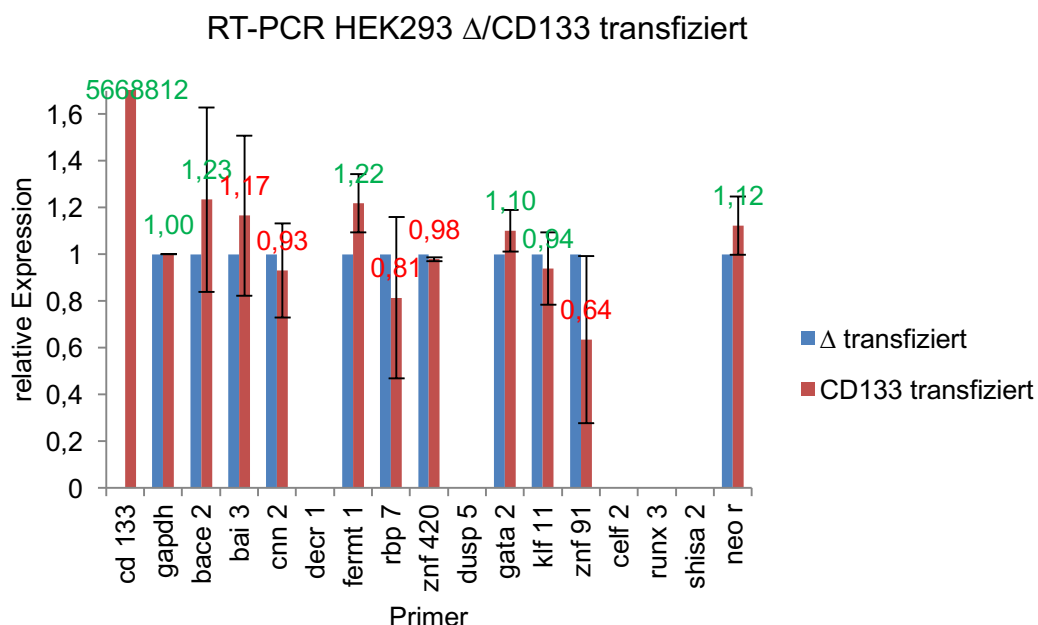


Abbildung 4.7: Auswertung von drei unabhängigen RT-PCRs mit HEK293 Δ Plasmid und CD133-Expressionsplasmid transfizierten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Mittelwerte der Genregulation, die mit den Microarray-Daten übereinstimmen, sind in grün dargestellt. Rote Mittelwerte zeigen eine inverse Regulation im Vergleich zu den Microarray-Ergebnissen.

Die Auswertung der mRNA-Regulation der potentiellen Zielgene war teilweise extrem differierend zu den Microarray-Daten und den RT-PCR-Ergebnissen der

Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert (Abschnitt 4.2.1.1). Bei den Genen DECR1, CELF2, RUNX3 und SHISA2 konnte in der RT-PCR keine mRNA detektiert werden. Die Richtung der relativen Expression für BAI3, CNN2, RBP7, ZNF420 und ZNF91 verhielt sich invers zu den Microarray-Ergebnissen der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert. Deshalb sind die Mittelwerte der unabhängigen Experimente in Abbildung 4.7 in rot dargestellt. Anders verhielt es sich bei der Genregulation von BACE2, FERMT1, GATA2 und KLF11: Die Richtung der relativen Expression zwischen CD133 Leerplasmid transfizierten HEK293 Zellen und der HEK293 Subpopulation, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden war, stimmte mit den Ergebnissen der Microarray-Daten überein. Die Mittelwerte der relativen Expression dieser Gene sind in Abbildung 4.7 in grün dargestellt.

4.2.1.3 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in den Zelllinien HeLa Δ /CD133 mittels RT-PCR

Die Zelllinie HeLa wurde ursprünglich aus humanen epithelialen Zervixkarzinom-Zellen isoliert und stabil kultiviert. Die HeLa Zelllinie wurde wie HEK293 Wildtypzellen (siehe Abschnitt 4.2.1.2) mit dem gleichen CD133 Expressionsplasmid und dem entsprechenden Leerplasmid als Kontrolle transfiziert und stabil unter Selektionsmedium mit Neomycin in Kultur gehalten. Interessant für dieses Experiment war die Frage, ob sich die Expression von CD133 und potentieller Zielgene bei einer weiteren endogen für CD133 negativen Zelllinie gleich verhält wie bei der Zelllinie HEK293, die mit den gleichen Plasmiden transfiziert worden war. Außerdem war es interessant die Ergebnisse der Genregulation mit den Ergebnissen der RT-PCR der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert und den Daten des Microarrays zu vergleichen. Die erfolgreiche Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid konnte jeweils durch den Nachweis der mRNA für das Neomycin Resistenz-Gen (neo r), welches sich auf beiden Plasmiden befindet, bewiesen werden. Normiert wurden die Ergebnisse der beiden Subpopulationen für jedes unabhängige Experiment auf die GAPDH-Expression, um eine Vergleichbarkeit der Expressionshöhe für jedes Gen gewährleisten zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Subpopulation HeLa Δ transfiziert, keine mRNA für CD133 exprimiert, die HeLa Zellen, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden waren, eine starke relative

ve Expression von CD133 mit einem Wert von 2159920 aufweisen. Die folgende Abbildung 4.8 zeigt die relative Expression der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in der RT-PCR für die Zelllinie HeLa Δ und CD133-Expressionsplasmid transfiziert.

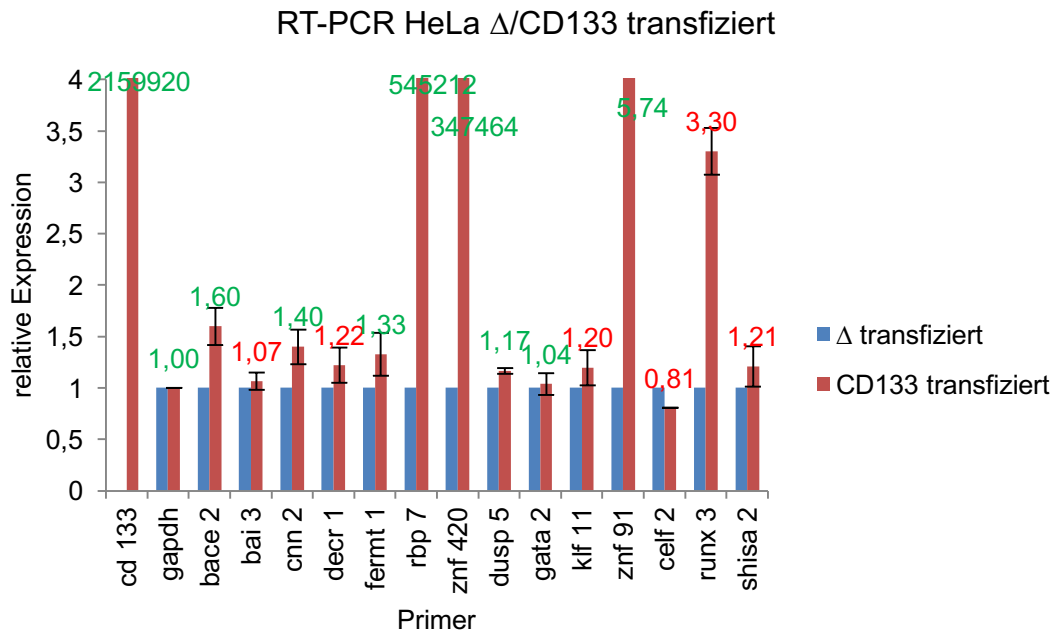


Abbildung 4.8: Auswertung von drei unabhängigen RT-PCRs der Zelllinie HeLa CD133 und Leerplasmid transfiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Grün unterlegte Werte zeigen die Übereinstimmung mit den Microarray-Daten von HEK293 CD133^{-/+} angereichert an, rote Zahlen stehen für eine inverse Regulation.

Anders als bei den vorhergehenden untersuchten Zelllinien (siehe Abschnitt 4.2.1.2) exprimiert HeLa alle untersuchten Gene auf mRNA-Ebene. Die Richtung der Regulation stimmt jedoch nur teilweise mit dem DNA-Microarray für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert überein: Die relative Expression für die Gene BAI3, DECR1, KLF11, CELF2, RUNX3 und SHISA2 zeigte eine inverse Regulation. Die Mittelwerte für die unabhängigen Experimente dieser Zelllinie sind in Abbildung 4.8 deshalb in rot dargestellt. Anders verhielt es sich für die Richtung der relativen Expression für die Gene BACE2, CNN2, FERMT1, RBP7, ZNF420, DUSP5, GATA2 und ZNF91: Die Richtung der relativen Expression für die potentiellen Zielgene von CD133 stimmte mit den Microarray-Ergebnissen für HEK293 CD133^{-/+} angereichert überein. Deshalb sind die Mittelwerte für die relative Expression dieser Gene in Abbildung 4.8 in grün dargestellt.

4.2.1.4 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in den Zelllinien CaCo-2 csi/siRNA mittels RT-PCR

Im Folgenden wurde die endogen CD133-exprimierende Zelllinie CaCo-2 detaillierter untersucht. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit einer Kontroll-siRNA, die keine Interaktionen in der Zelle bewirkt, zweifach transfiziert. Die andere Hälfte der Zellen wurde doppelt mit einer siRNA gegen CD133 transfiziert, um die Expression von CD133 zu supprimieren. Wie bereits auf Proteinebene im Western Blot gezeigt, war die zweifache Transfektion von CaCo-2 mit CD133 siRNA bzw. csiRNA effektiv (siehe Abschnitt 4.1.1). Bei diesem Experiment sollte erstens untersucht werden, ob endogen CD133-positive Zellen die potentiellen Zielgene auf mRNA-Ebene gleichermaßen exprimieren wie die Zelllinie HEK293 CD133⁺ angereichert. Zweitens war es interessant, ob bei Unterdrückung der CD133-Expression durch siRNA die potentiellen Zielgene ebenso reguliert sind wie bei der Subpopulation HEK293 CD133⁻ angereichert. Drittens konnten die gewonnenen Ergebnisse dann mit den Microarray-Daten (siehe Tabelle 4.1) verglichen werden. Für beide Subpopulationen der CaCo-2 Zellen wurden die relativen Expressionen in jedem unabhängigen Experiment jeweils auf die GAPDH-Expression normiert. Dies diente dazu eine Vergleichbarkeit des Expressionslevels für jedes potentielle Zielgen zu ermöglichen.

Die erfolgreiche Transfektion mittels csi/siRNA gegen CD133 konnte durch Bestimmung des CD133-Expressionslevels in beiden Subpopulationen nachgewiesen werden. Die relative Expression von CD133 reduzierte sich bei CaCo-2 siRNA transfiziert im Vergleich zu der csiRNA transfizierten CaCo-2 Subpopulation auf 46% (siehe Abbildung 4.9). Dies bedeutet eine durchschnittliche Suppression der CD133 mRNA-Menge um 54%. Außerdem wurde die Regulation jedes einzelnen Zielgens auf die relative CD133-Expression von CaCo-2 csiRNA transfiziert normiert. Dies sollte eine Vergleichbarkeit der Regulationslevels aller untersuchten Zielgene schaffen. Die folgende Abbildung 4.9 zeigt die relative Expression der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene in der RT-PCR für die Zelllinie CaCo-2 csi/siRNA transfiziert.

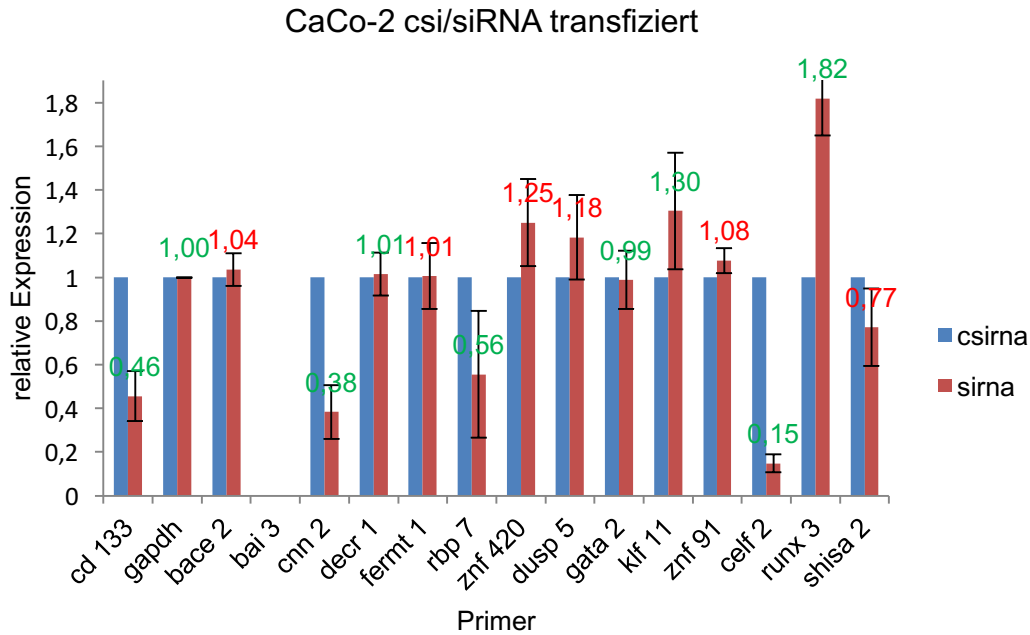


Abbildung 4.9: Auswertung von drei unabhängigen RT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie CaCo-2. Die beiden Subpopulationen waren zum einen mit einer siRNA gegen CD133 und zum anderen mit einer Kontroll-siRNA doppelt transfiziert worden. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Grün dargestellt sind die Werte, welche sich vom Trend der Genregulation mit dem DNA-Microarray für HEK293 CD133^{-/+} angereichert decken, rote Zahlen zeigen eine inverse Regulation.

Die mRNA des Gens BAI3 konnte bei dieser Zelllinie nicht detektiert werden. Die Ergebnisse für die Zielgene DECR1 und GATA2 waren nicht signifikant, wenn auch eine Expression der zwei Gene in beiden Subpopulationen von CaCo-2 nachgewiesen werden konnte. Die restliche Genregulation stimmt nur teilweise mit dem DNA-Microarray überein. Die Gene BACE2, FERMT1, ZNF420, DUSP5, ZNF91 und SHISA2 zeigten im Vergleich zur Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert eine inverse Regulation. Die Mittelwerte der unabhängigen Experimente für die relative Expression dieser Gene sind deshalb in Abbildung 4.9 in rot gezeigt. Anders verhielt es sich bei der Genregulation von CNN2, RBP7, KLF11, CELF2 und RUNX3: Die Richtung der relativen Expression zwischen Kontroll-siRNA transfizierten CaCo-2 Zellen und der CaCo-2 Subpopulation, die mit einer siRNA gegen CD133 doppelt transfiziert worden war, stimmte mit den Ergebnissen der Microarray-Daten für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert überein. Die Mittelwerte der relativen Expression dieser Zielgene sind in Abbildung 4.9 in grün dargestellt.

4.2.1.5 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert mittels RT-PCR

Im Folgenden sollten Ergebnisse zur Regulation potentieller Zielgene von CD133 in einer zweiten endogen CD133-exprimierenden Zelllinie verifiziert werden. Hierzu wurde die Zelllinie MDA-MB468 detailliert untersucht. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit der gleichen Kontroll-siRNA wie für die Zelllinie CaCo-2 (siehe Abschnitt 4.2.1.4), die keine Interaktionen in der Zelle bewirkt, zweifach transfiziert. Die andere Hälfte der MDA-MB468 Zellen wurde doppelt mit der gleichen siRNA, wie sie für CaCo-2 benutzt wurde, transfiziert, um die Expression von CD133 zu supprimieren. Wie bereits auf Proteinebene im Western Blot gezeigt, war die zweifache Transfektion von MDA-MB468 mit CD133 siRNA und Kontroll siRNA erfolgreich (siehe Abschnitt 4.1.2): Es zeigte sich eine Unterdrückung der CD133-Expression von 59%. Bei diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob endogen CD133-positive Zellen die potentiellen Zielgene auf mRNA-Ebene gleichermaßen exprimieren wie die Zelllinie HEK293 CD133⁺ angereichert. Des Weiteren war es interessant, ob bei Unterdrückung der CD133-Expression durch siRNA die potentiellen Zielgene gleichermaßen reguliert sind wie bei der Subpopulation HEK293 CD133⁻ angereichert. Die gewonnenen Ergebnisse konnten dann in einem zweiten Schritt mit den Microarray-Daten (siehe Tabelle 4.1) verglichen werden. Außerdem konnte durch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Zelllinie CaCo-2 festgestellt werden, ob es eine Unterscheidung in der Regulation potentieller Zielgene von CD133 bei einer zweiten endogen CD133-exprimierenden Zelllinie gibt. Die erfolgreiche Transfektion der MDA-MB468 Zellen mittels Kontroll- bzw. siRNA gegen CD133 konnte auch auf mRNA-Ebene in der RT-PCR bestätigt werden. Die Suppression der CD133-Expression bei der Subpopulation MDA-MB468 siRNA transfiziert gelang auf einen Wert von 33%, was eine durchschnittliche Reduktion der relativen mRNA-Expression um 67% bedeutet (siehe Abbildung 4.10). Außerdem wurde die Regulation jedes einzelnen Zielgens auf die relative Expression von CD133 bei den csiRNA transfizierten MDA-MB468 normiert, um eine Vergleichbarkeit in der Höhe der Regulation aller untersuchten Zielgene zu gewährleisten. Die folgende Abbildung 4.10 zeigt die relative Expression der mRNA von CD133 und

der potentiellen Zielgene in der RT-PCR für die Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert.

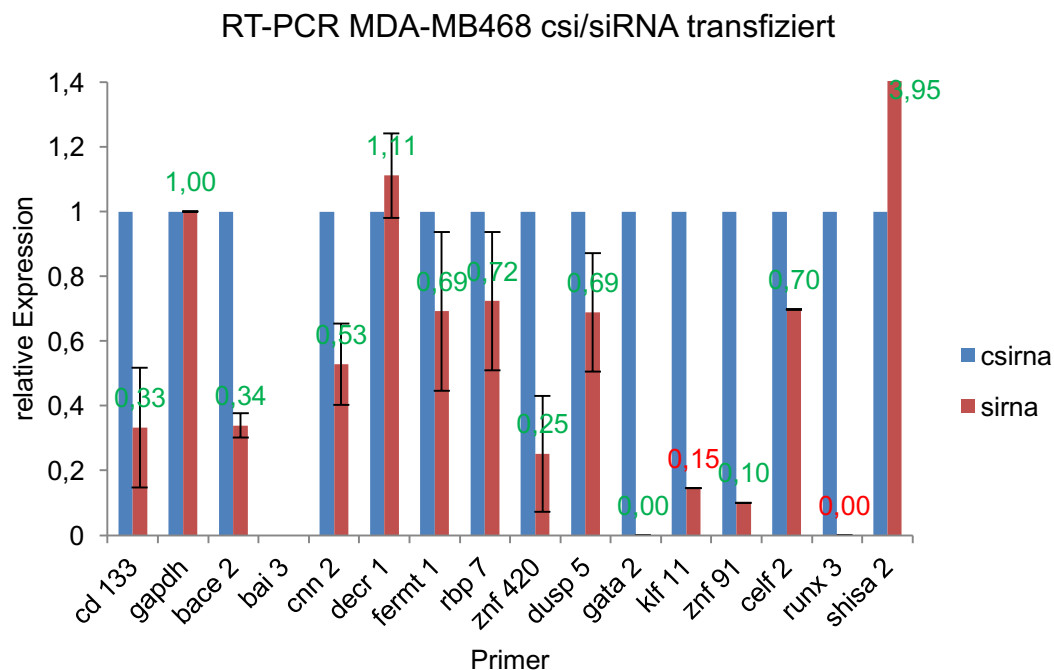


Abbildung 4.10: Auswertung von drei unabhängigen RT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468. Die beiden Subpopulationen waren zum einen mit einer siRNA gegen CD133 und zum anderen mit einer Kontroll-siRNA doppelt transfiziert worden. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Grüne Zahlen zeigen eine Kongruenz mit dem DNA-Microarray für HEK293 CD133^{-/+} angereichert an. Rot markierte Zahlen stellen die Zielgene dar, die invers reguliert sind.

Die mRNA des Gens BAI3 konnte wie im vorangehenden Versuch bei der Zelllinie CaCo-2 ebenfalls nicht detektiert werden. Eine inverse Regulation der relativen Expression potentieller Zielgene von CD133, d.h. entgegengesetzt zu den Daten der Microarray-Analyse, zeigte sich für KLF11 und RUNX3. Die Mittelwerte der unabhängigen Experimente für diese Gene sind in Abbildung 4.10 deshalb in rot dargestellt. Anders verhielt es sich bei der Genregulation von BACE2, CNN2, DECR1, FERMT1, RBP7, ZNF420, DUSP5, GATA2, ZNF91, CELF2 und SHISA2: Die Richtung der relativen Expression zwischen csi/siRNA transfizierten MDA-MB468 Zellen stimmte mit den Ergebnissen der Microarray-Daten für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert überein. Die Mittelwerte der relativen Expression dieser Zielgene sind in Abbildung 4.10 in grün dargestellt. Im Vergleich mit den vorangehend drei gezeigten Zelllinien (siehe Abschnitte

4.2.1.2 bis 4.2.1.4) kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sich bei dieser Zelllinie insgesamt die größte Übereinstimmung der untersuchten Gene mit dem DNA-Microarray und den Werten der RT-PCR für HEK293 CD133^{-/+} angereicherte Zellen zeigte.

4.2.1.6 Korrelation der Genexpression zwischen den Zelllinien HEK293 CD133^{-/+} angereichert und MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert

Wie im vorangehenden Abschnitt 4.2.1.5 gezeigt, ist die Korrelation der potentiellen Zielgene für CD133 bei der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert mit den Microarray-Daten für HEK293 CD133^{-/+} angereichert am größten. Deshalb wurden diese beiden Zelllinien noch genauer untersucht. Interessant ist der Vergleich einer potentiellen Genregulation durch CD133 bei diesen beiden Zelllinien, da HEK293 im Wildtyp endogen kein CD133 exprimiert, MDA-MB468 jedoch endogen positiv für CD133 ist. Jetzt kann einerseits die Auswirkung einer Transfektion mit CD133 durch ein Plasmid untersucht werden und andererseits eine Suppression von CD133 durch Transfektion mit einer siRNA gegen CD133. D.h. sowohl die Folgen des Verlusts der CD133-Aktivität als auch der Zugewinn der CD133-Expression können untersucht werden. Anhand der Auswertung der RT-PCR Ergebnisse, wurden für die nun folgenden qRT-PCR Experimente, Gene ausgewählt, die in beiden Zelllinien gleichermaßen reguliert waren und auch im Microarray kongruente Werte gezeigt hatten.

Tabelle 4.2: Ausgewählte Zielgene von CD133, die bei HEK293 CD133^{-/+} angereichert und MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert gleichermaßen reguliert sind.

Migration:	CNN2
	FERMT1
Proliferation:	BAI3
	DUSP5
Metabolismus/zelluläre Signalwege:	BACE2
Transkriptionsfaktor:	GATA2
	ZNF91
	ZNF420

Da die qRT-PCR ein innovativeres Verfahren ist und damit die Ergebnisse sowohl exakter als auch valider sind, wurden für ausgewählte Zielgene (siehe Tabelle 4.2) Primer für die Realtime RT-PCR angefertigt. Die Gene wurden in Tabelle 4.2 bezüglich ihrer zellulären Funktion in vier Hauptgruppen eingeteilt. Die exakte Funktion jedes einzelnen Gens wurde bereits in Tabelle 4.1 gezeigt und eingehender beschrieben.

4.2.2 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mittels qRT-PCR

Die Echtzeitmessung der mRNA Menge mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green I und darauf folgender Schmelzkurvenanalyse ist ein genaueres, moderneres Verfahren als eine konventionelle RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Für die qRT-PCR wurden als interne Kontrolle vier verschiedene Housekeeping Gene benutzt:

- GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
- HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)
- β -Aktin
- RPL13a (ribosomales Protein L13a)

Als Negativkontrolle wurde Wasser bzw. RNA statt cDNA als Matrize für die qRT-PCR zugegeben und ein Fehlen von Fluoreszenzsignalen kontrolliert. Gemittelt wurde in jedem Experiment der Wert von drei Proben für jedes Gen in den unterschiedlichen Zelllinien. Zuletzt wurde die Expression jedes einzelnen Gens immer auf den Mittelwert der Quantifizierung der Housekeeping Gene normiert.

4.2.2.1 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mit Gesamt-RNA der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+ angereichert} mittels qRT-PCR

Um die in Tabelle 4.1 gezeigten Zielgene nochmals eingehender mittels qRT-PCR zu untersuchen, wurde wie für die RT-PCR im Vorversuch (siehe 4.2.1.1), die mRNA der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+ angereichert} verwendet. Die folgende Abbildung 4.1 veranschaulicht die Auswertung von 3 unabhängigen qRT-PCR Versuchen.

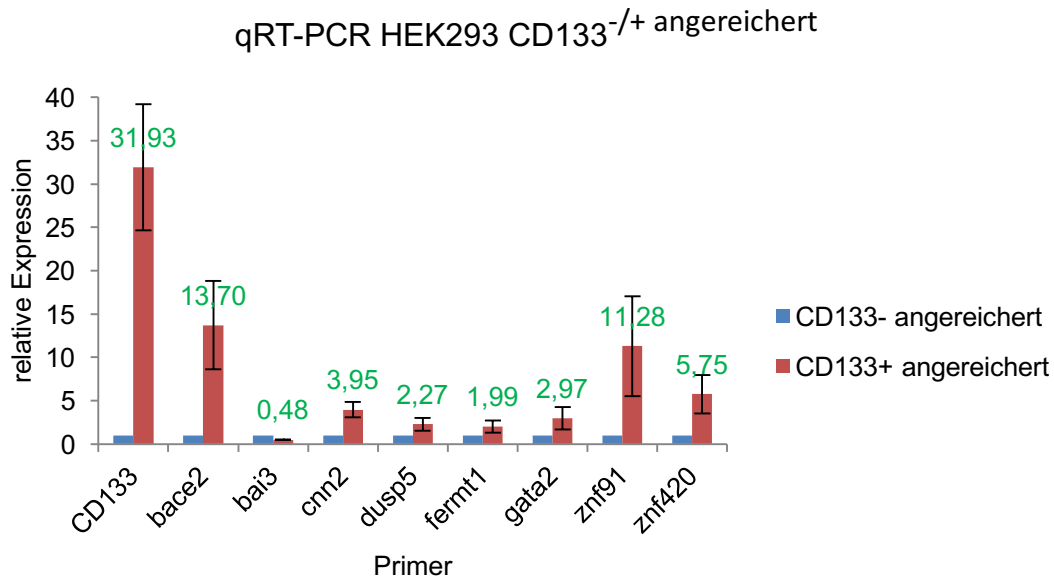


Abbildung 4.1: Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Grün unterlegte Werte zeigen die Übereinstimmung der Regulation mit den Microarray-Daten für die gleiche Zelllinie.

Die mittels qRT-PCR gemessene Induktion oder Repression der selektierten Gene stimmte mit den Ergebnissen aus RT-PCR und Microarray Messungen überein. Dies ist durch grün unterlegte Zahlen in Abbildung 4.11 dargestellt. Die mRNA der HEK293 CD133⁺ angereicherten Subpopulation zeigt für CD133 eine 32-fache Erhöhung der relativen CD133 Expression im Vergleich zu HEK293 CD133⁻ angereicherten Zellen. In der RT-PCR für die mRNA der gleichen Zellen zeigte sich nur eine 2-fache Erhöhung der relativen Expression für CD133. Anders verhielt es sich bei der Auswertung der Daten für BACE2: Die Microarray-Ergebnisse zeigten eine Heraufregulation auf das 47-fache, die RT-PCR noch auf das 21-fache, hier in der qRT-PCR konnte nur noch eine Erhöhung der Expression auf das 14-fache festgestellt werden. Ein identisches Ergebnis in der qRT-PCR und den Microarray-Daten zeigte sich für das Zielgen BAI3. Es kam zu einer Reduktion der relativen Expression auf 50% bei der Subpopulation HEK293 CD133⁺ angereichert. In der RT-PCR lag der Wert hingegen bei 70%. Die Regulation für das Gen CNN2 zeigte in der qRT-PCR mit einem Wert von 4 größere Ähnlichkeit zum Microarray (4,9) als die RT-PCR (3,2). Gleiches gilt für DUSP5: Im Microarray zeigte sich ein Wert von 3,3, in der qRT-PCR von 2,3, in der RT-PCR nur eine Heraufregulation auf 1,5. Eine größere Übereinstimmung

zwischen Microarray-Daten und RT-PCR zeigte die Auswertung für das Zielgen FERMT1: Im Microarray zeigte sich mit einer Heraufregulation auf 4,3 ein ähnliches Ergebnis wie in der RT-PCR (5,0), während die qRT-PCR Messung mit einem Wert von 2 für die Subpopulation HEK293 CD133⁺ angereichert einen deutlich geringeren Anstieg aufwies. Bei GATA2 zeigte sich wiederum eine größere Kongruenz der Ergebnisse zwischen Microarray (2,2) und qRT-PCR (3,0) als zur RT-PCR (3,4). Bei dem Zielgen ZNF91 konnte eine ähnliche Regulation bei Microarray (2,3) und RT-PCR (4,0) nachgewiesen werden. Eine stärkere Regulation von ZNF91 zeigte sich in der qRT-PCR mit einer relativen Expression von 11,3. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Auswertung für das Gen ZNF420 gewonnen: Im Microarray (2,0) und der RT-PCR (2,1) war die Regulation annähernd gleich, in der qRT-PCR mit einem Wert von 5,8 stärker ausgeprägt. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass zwar die Richtung der Regulation für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert, sowohl in der RT-PCR als auch in der qRT-PCR mit den Microarray-Daten übereinstimmt, die Höhe der Regulation jedoch bei beiden Untersuchungsverfahren für die einzelnen Gene teilweise differiert.

4.2.2.2 Quantifizierung der mRNA von CD133 und potentieller Zielgene mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert mittels qRT-PCR

Um die Genregulation potentieller Zielgene von CD133 mit einer endogen CD133-exprimierenden Zelllinie zu prüfen, wurde die gleiche mRNA der doppelt si- bzw. Kontroll-RNA transfizierten Zelllinie MDA-MB468 wie in 4.2.1.5 für ein weiteres qRT-PCR Experiment verwendet. Die Ergebnisse wurden dann einerseits mit den Microarray-Daten für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert und andererseits mit den RT-PCR Ergebnissen der gleichen Zelllinie (siehe 4.2.1.5) verglichen. Dies sollte die Frage beantworten, ob eine endogen CD133-positive Zelllinie eine ähnliche Regulation der untersuchten potentiellen Zielgene aufweist wie eine Zelllinie, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden war. In der folgenden Abbildung 4.12 ist die Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs für die mRNA von CD133 und den potentiellen Zielgenen der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert graphisch dargestellt.

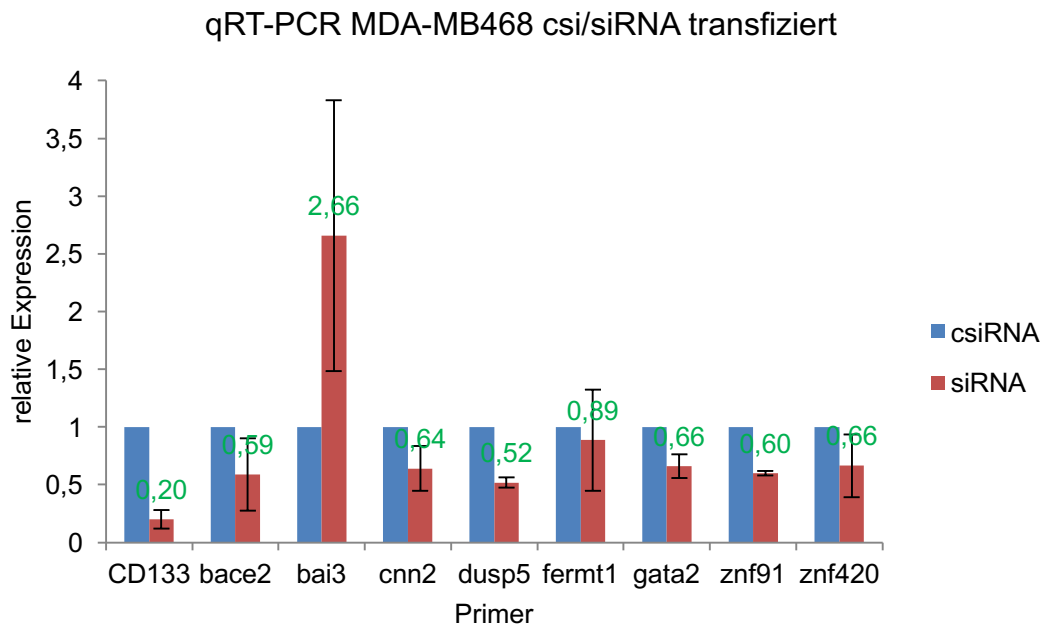


Abbildung 4.2: Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Die grün markierten Zahlen zeigen die Übereinstimmung der Genregulation mit den Microarray-Ergebnissen.

Wie durch grüne Zahlen in Abbildung 4.2 gezeigt, stimmt die Richtung der relativen Expression von CD133 und aller potentiellen Zielgene mit den Microarray-Ergebnissen für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert und auch den RT-PCR Ergebnissen für die gleiche Zelllinie MDA-MB468 überein.

Die folgende Tabelle 4.3 zeigt, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, die Regulation der mRNA von CD133 und den potentiellen Zielgenen in der RT-PCR sowie der qRT-PCR bei MDA-MB468 siRNA transfiziert und im Microarray von HEK293 CD133⁻ angereichert. Die Werte für die Microarray-Daten in der Tabelle berechnen sich beispielhaft folgendermaßen: Das potentielle Zielgen bace2 zeigt bei der Zelllinie HEK293 CD133⁺ angereichert eine Induktion um das 47-fache im Vergleich zur Zelllinie HEK293 CD133⁻ angereichert. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass HEK293 CD133⁻ angereichert eine Suppression von bace2 auf 2% ($1/47 \times 100$) im Vergleich zu HEK293 CD133⁺ angereichert aufweisen. Dargestellt sind in diesem Fall die Regulationen von HEK293 CD133⁻ angereichert, da diese Subpopulation die Expressionshöhe der Zielgene ohne möglichen Einfluss einer CD133-Expression veranschaulicht und somit vergleichbar ist mit der

Zelllinie MDA-MB468 siRNA transfiziert, bei der die CD133-Expression supprimiert ist.

Tabelle 4.3: Regulation der mRNA von CD133 und den potentiellen Zielgenen in der RT-PCR sowie der qRT-PCR bei der Zelllinie MDA-MB468 siRNA transfiziert und im Microarray bei der Zelllinie HEK293 CD133⁻ angereichert. Die jeweiligen Regulationen sind bei der Zelllinie MDA-MB468 siRNA transfiziert sind in % angegeben und beziehen sich dabei auf die Zelllinie MDA-MB468 siRNA transfiziert. Bei den Microarray-Ergebnissen ist die Regulation (in %) von HEK293 CD133⁻ angereichert bezogen auf die Zelllinie HEK293 CD133⁺ angereichert aufgelistet, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Somit sind die Genregulationen bei den weniger bzw. kein CD133-exprimierenden Subpopulationen der Zelllinien gezeigt.

Zielgen	qRT-PCR MDA-MB468 siRNA transfiziert	RT-PCR MDA-MB468 siRNA transfiziert	Microarray HEK293 CD133 ⁻ angereichert
CD133	20% ↓	30% ↓	∅
bace2	60% ↓	30% ↓	2% ↓
bai3	270% ↑	∅	210% ↑
cnn2	60% ↓	50% ↓	20% ↓
dusp5	50% ↓	70% ↓	30% ↓
fermt1	90% ↓	70% ↓	20% ↓
gata2	70% ↓	∅	50% ↓
znf91	60% ↓	10% ↓	40% ↓
znf420	70% ↓	30% ↓	50% ↓

Die relative Expression von CD133 durch zweifache Transfektion mit einer siRNA gegen CD133 zeigte in MDA-MB468 Zellen, welche mit CD133-spezifischer siRNA transfiziert wurden, eine Herunterregulation auf 20% im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten MDA-MB468 Zellen. In der RT-PCR (siehe 4.2.1.5) betrug dieser Wert 30%. Bei den Zielgenen bai3, dusp5 und gata2 liegen die Ergebnisse der qRT-PCR sehr eng mit den Regulationen aus den Microarray-Daten zusammen. Wohingegen die mRNA der Zielgene bace2, cnn2 und fermt1 in der Auswertung der RT-PCR Daten ähnlicher reguliert ist als in der qRT-PCR im Vergleich mit dem Microarray für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert. Bei der Regulation der Zielgene znf91 und znf420 liegen die Werte des Microarray zwischen den Ergebnissen der RT-PCR bzw. der qRT-PCR.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass der Unterschied der CD133-Expression zwischen MDA-MB468 *csiRNA* und *siRNA* transfiziert auf mRNA Ebene gut zu erkennen ist. Die Regulation potentieller Zielgene von CD133 war teils in der Auswertung der RT-PCR Daten und teils in der qRT-PCR ausgeprägter. Die Richtung der Regulation stimmte für alle untersuchten Gene mit den Microarray-Daten für die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert überein.

4.3 Auswirkung von Zellstress auf Zelllinien *in vitro*

Im vorangehenden Kapitel wurde beschrieben, wie die untersuchten Gene in An- und Abwesenheit von CD133 auf mRNA- und Protein-Ebene exprimiert werden. Ein weiterer interessanter Punkt ist jedoch auch, was mit CD133 und folglich auch mit den möglicherweise mitregulierten Genen passiert, wenn die Zellen gestresst werden. Denn während der Karzinogenese sind Tumorzellen zum Teil widrigen Bedingungen wie Sauerstoff- oder Nährstoffmangel ausgesetzt. Sie schaffen es durch Veränderungen ihres Zellstoffwechsels jedoch trotzdem sich den neuen Voraussetzungen anzupassen. Die Tumorzellen initiieren Angiogenese im Tumorgewebe und disseminieren an im Körper entfernte Orte. *In vitro* können diese Bedingungen auf verschiedenen Wegen simuliert werden: Zum einen durch den Entzug von Sauerstoff, zum anderen auch durch den Entzug von Nährstoffen. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um sich mit der Frage zu beschäftigen, wie sich die Morphologie, die Proliferation, die CD133-Expression und die Genregulation der potentiellen Zielgene unter oben beschriebenem Zellstress verhalten.

4.3.1 Auswirkung von Hypoxie (0,1% O₂) auf Zelllinien *in vitro*

Für die folgenden Versuche wurden verschiedene Zelllinien nach Adhäsion *in vitro* unter normalen Nährstoffbedingungen für festgesetzte Zeitspannen in einem Inkubator bei 0,1% Sauerstoffgehalt kultiviert. Interessant für diese Experimente sind vor allem die beiden Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468, da sie endogenes CD133 exprimieren und somit eine Veränderung der CD133-Expression und der potentiellen Zielgene näher untersucht werden können. Es

sollte bestimmt werden, ob CD133 als Tumormarker unter Zellstress möglicherweise heraufreguliert wird und sich die Zielgene dementsprechend hinsichtlich ihrer relativen Expression auf mRNA Ebene wie in den Microarray-Daten (siehe Tabelle 4.1) verhalten. Zusätzlich wurden aber auch HEK293 Wildtypzellen und die Zelllinie HeLa, die endogen kein CD133 exprimieren, in die Versuche eingeschlossen und ausgewertet.

4.3.1.1 Proliferation und Zellmorphologie verschiedener Zelllinien unter Hypoxie

Zunächst wurden die verschiedenen Zelllinien sowohl hinsichtlich Proliferation, als auch hinsichtlich der Zellmorphologie, d.h. das Aussehen der Zellen unter dem Mikroskop, genauer untersucht. Nachdem die Zellen für festgesetzte Zeiträume (3, 6 und 9 Tage) unter Hypoxie (0,1% Sauerstoff) inkubiert wurden, wurden mögliche Veränderungen mit einer Kontrollgruppe der jeweiligen Zelllinie, die für den gleichen Zeitraum unter Standardbedingungen von 21% Sauerstoff kultiviert worden war, verglichen. Untersucht wurden vier verschiedene Zelllinien: zum einen HEK293 und HeLa als CD133-negative Wildtypzelllinien und zum anderen CaCo-2 und MDA-MB468, die endogenes CD133 exprimieren. Die Abbildungen 4.3 bis 4.6 zeigen die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe im jeweils gleichen Maßstab nach sechs Tagen unter dem Mikroskop fotografiert.

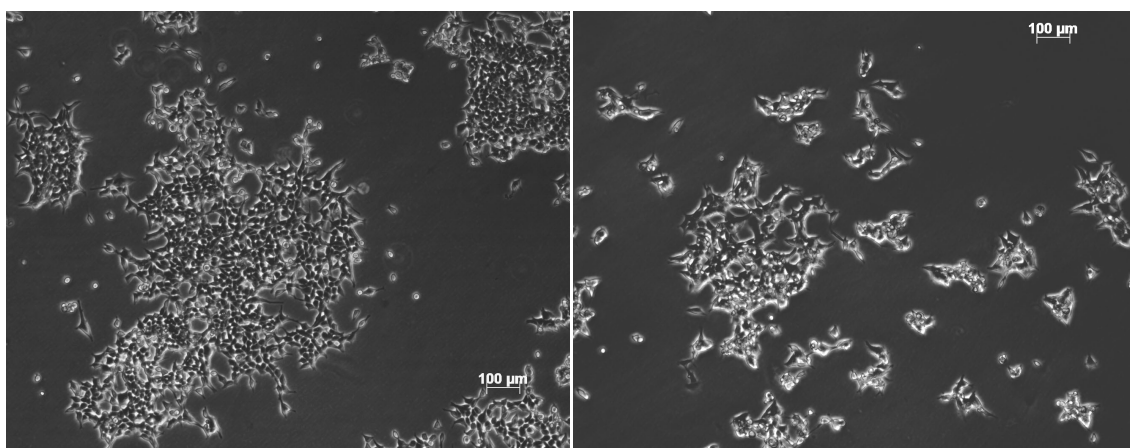


Abbildung 4.3: HEK 293 nach 6 Tagen bei 21% O₂ links und bei 0,1% O₂ rechts im Bild.

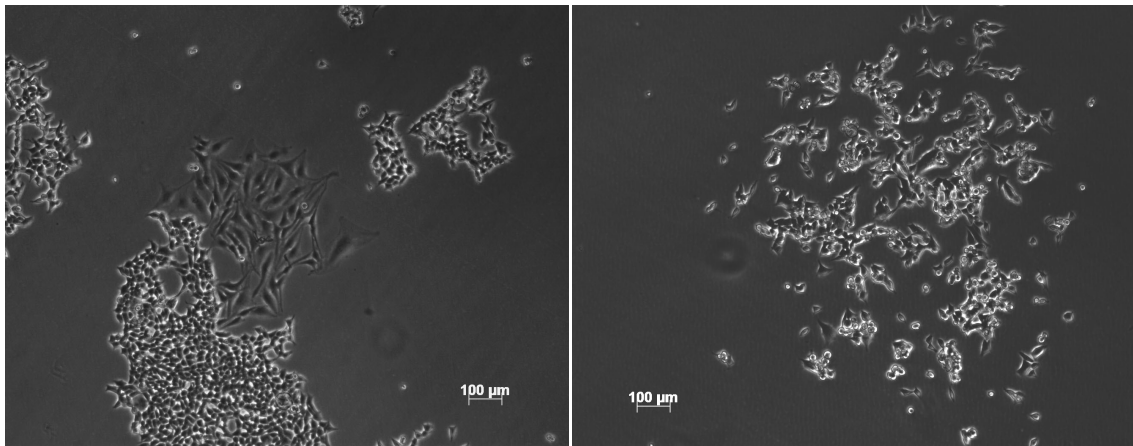


Abbildung 4.4: HeLa nach 6 Tagen bei 21% O₂ links und bei 0,1% O₂ rechts im Bild.

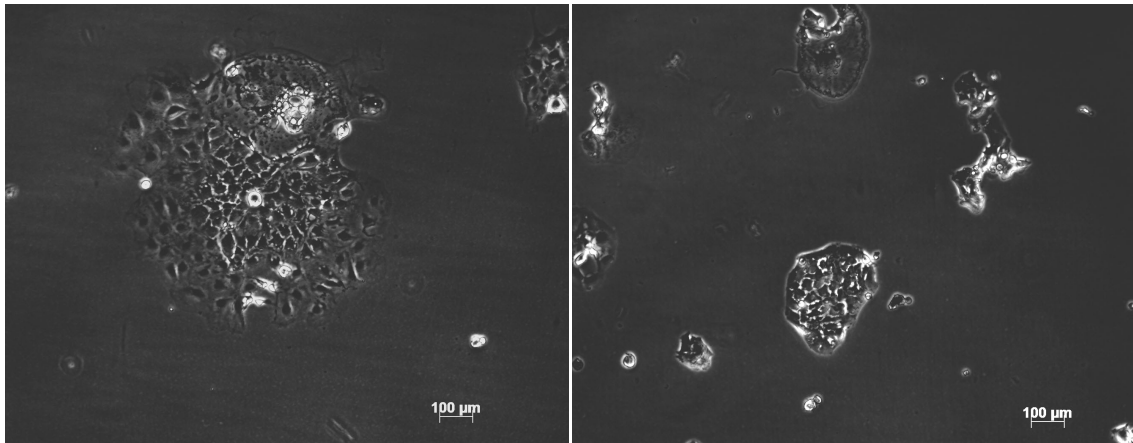


Abbildung 4.5: CaCo-2 nach 6 Tagen bei 21% O₂ links und bei 0,1% O₂ rechts im Bild.

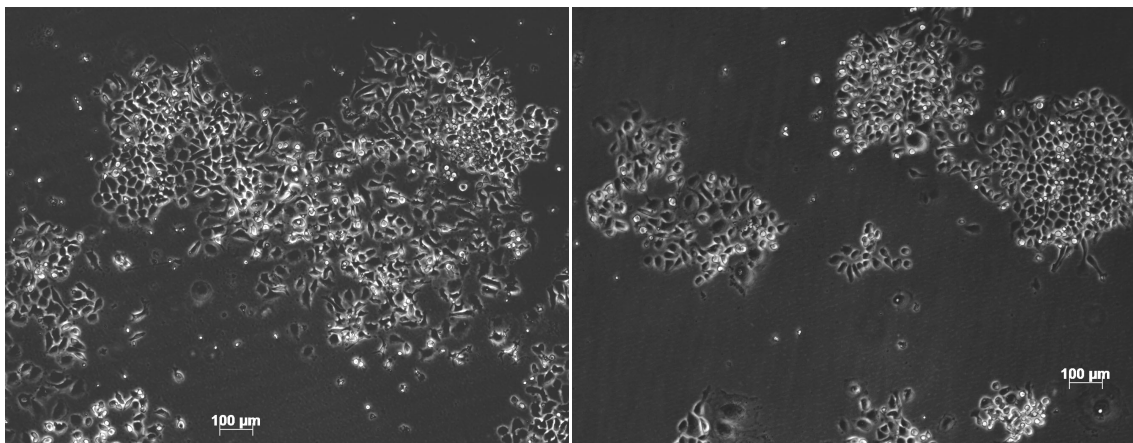


Abbildung 4.6: MDA-MB468 nach 6 Tagen bei 21% O₂ links und bei 0,1% O₂ rechts im Bild.

Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Bereits unter dem Mikroskop ist die stark unterschiedliche Zellzahl bei verändertem Sauerstoffgehalt im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bei jeder der vier Zelllinien gut zu erkennen. Einerseits expandieren die Zellen unter hypoxischen Bedingungen räumlich nicht so stark und andererseits ist auch die Proliferationsrate der Zelllinien unter verminderten Sauerstoffbedingungen trotz sonst gleicher Nährstoffbedingungen viel restriktiver. Zudem weisen unter Hypoxie kultivierte Zellen morphologisch eine verminderte, kugelförmige Oberfläche auf.

Auf den visuellen Eindruck unter dem Mikroskop folgend wurden die Zellen der Versuchs- und der Kontrollgruppe nun geerntet und ausgezählt. Bereits abgestorbene Zellen wurden für die nun folgende Zählung durch Färbung mit Trypanblau aus der Bestimmung ausgeschlossen. Die Quantifizierung aller vitalen Zellen am Tag 9 zum Abschluss des Experiments zeigte einen signifikanten Unterschied in der Proliferation.

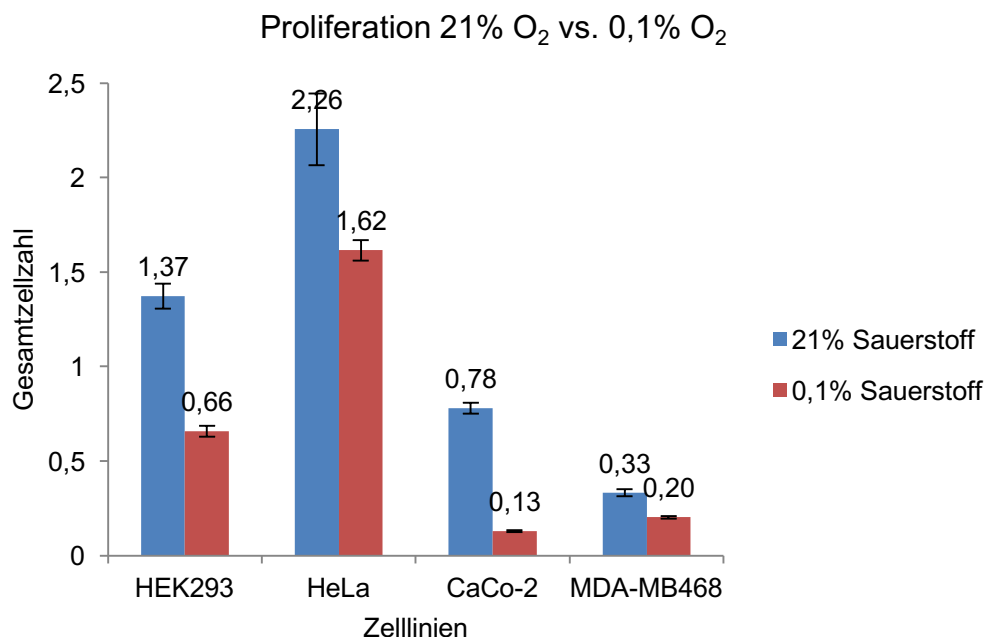


Abbildung 4.7: Auswertung der Proliferation von vier verschiedenen Zelllinien bei 21% O₂ und 0,1% O₂ nach neun Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen bei den Zelllinien HEK293, HeLa, CaCo-2 und MDA-MB468.

Abbildung 4.7 zeigt grafisch jeweils die Zellzahl der unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Versuchsgruppe und der unter normalen Sauerstoffbedingungen inkubierten Kontrollgruppe der vier untersuchten Zelllinien. Für die Auswertung wurde jeweils die Gesamtzellzahl der geernteten Zellen angegeben. Die Zelllinie HEK293 zeigte eine Einschränkung der Proliferation unter Hypoxie auf 50% (0,66:1,37) im Vergleich zur Proliferation unter 21% Sauerstoff. Bei den HeLa Zellen konnte eine Reduktion um 30% berechnet werden. Den stärksten Rückgang der Proliferation verzeichnete die Zelllinie CaCo-2 mit einer 80%igen Reduktion bei der Versuchsgruppe. Auch MDA-MB468 Zellen zeigten eine verminderte Proliferation auf einen Wert von 60%. Zusammengefasst kann also festgehalten werden, dass CaCo-2 die größte Einschränkung der Proliferation unter verminderten Sauerstoffbedingungen zeigte und HeLa Zellen den geringsten Rückgang der Proliferation durch Hypoxie verzeichneten.

4.3.1.2 Durchflusszytometrisch gemessene Expression von CD133 unter Hypoxie

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die CD133-Expression an der Zelloberfläche durch eine verminderte Sauerstoffzufuhr verändert wird. Dafür wurden die gleichen Zellen wie für den oben gezeigten Proliferationsversuch (siehe 4.3.1.1) verwendet und für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Standardisiert wurden alle durchflusszytometrischen Experimente mit dem ubiquitär, auf allen kernhaltigen Zellen vorkommenden Oberflächenprotein MHCI (major histocompatibility complex I). Auch die MHCI Expression zeigte eine Verminderung durch Sauerstoffentzug, die für die CD133-Auswertung jedoch berücksichtigt wurde. Da die Auswertung aber nur für endogen CD133-exprimierende Zellen von Interesse war, wurden ausschließlich CaCo-2 und MDA-MB468 ausgewertet. Denn in der Durchflusszytometrie wurde die relative Expression von CD133 gemessen, die bei den HEK293 und HeLa Wildtypzellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Versuchsgruppe nicht vorhanden ist. Das Experiment erfolgte ebenfalls wie die Zählung der Zellzahl nach 9 Tagen unter Hypoxie (0,1% Sauerstoff) bzw. Standardbedingungen von 21% Sauerstoff in der Kontrollgruppe.

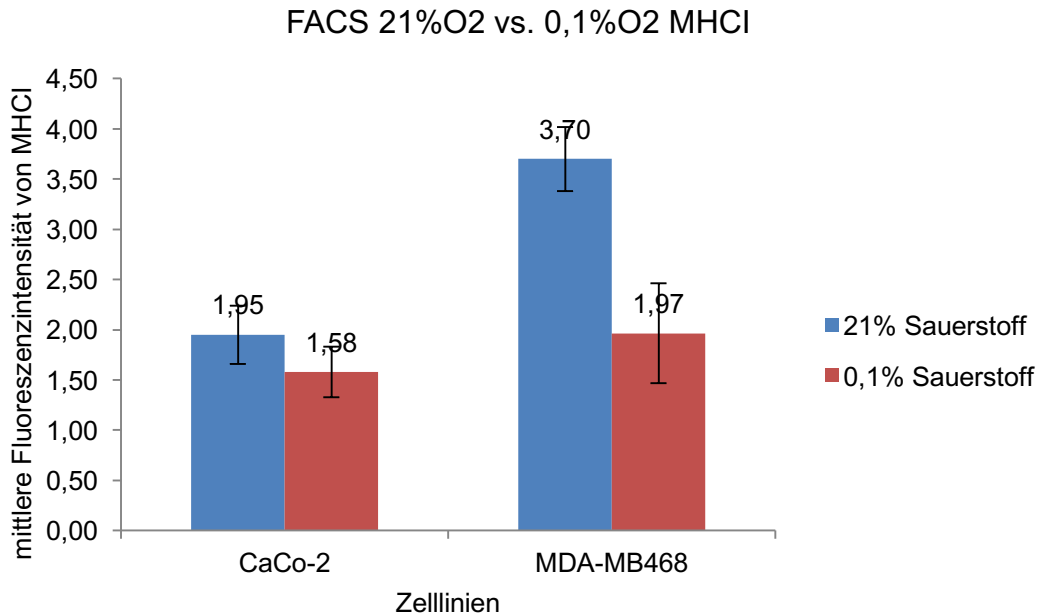


Abbildung 4.8: Durchflusszytometrisch gemessene MHC1 Expression der Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 21% O₂ und 0,1% O₂. Gezeigt sind die Mittelwerte und jeweilige Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, wurde MHC1 unter Hypoxie bei der Zelllinie MDA-MB468 viel stärker herunterreguliert als bei den CaCo-2 Zellen. Auf diese Veränderung der MHC1 Expression wurde die nun folgende Messung der relativen Intensität von CD133 für die jeweilige Zelllinie in jedem unabhängigen Experiment genormt. Die folgende Abbildung 4.9 zeigt grafisch die durchflusszytometrisch gemessene mittlere Fluoreszenzintensität von CD133 bei den untersuchten Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468.

Bei der Zelllinie CaCo-2 zeigt sich im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB468 unter Standardbedingungen eine gemessene mittlere Fluoreszenzintensität für CD133, die um den Faktor 3 höher ist (45,22:15,30). Betrachtet man die CD133 Expression für die Zelllinie CaCo-2, so zeigt diese bei den unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen eine 60%ige Reduktion (17,29:45,22) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nicht ganz so groß ist der durch Sauerstoffentzug hervorgerufene Unterschied der CD133 Expression bei der Zelllinie MDA-MB468. Hier konnte eine Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 auf 20% berechnet werden (12,5:15,3).

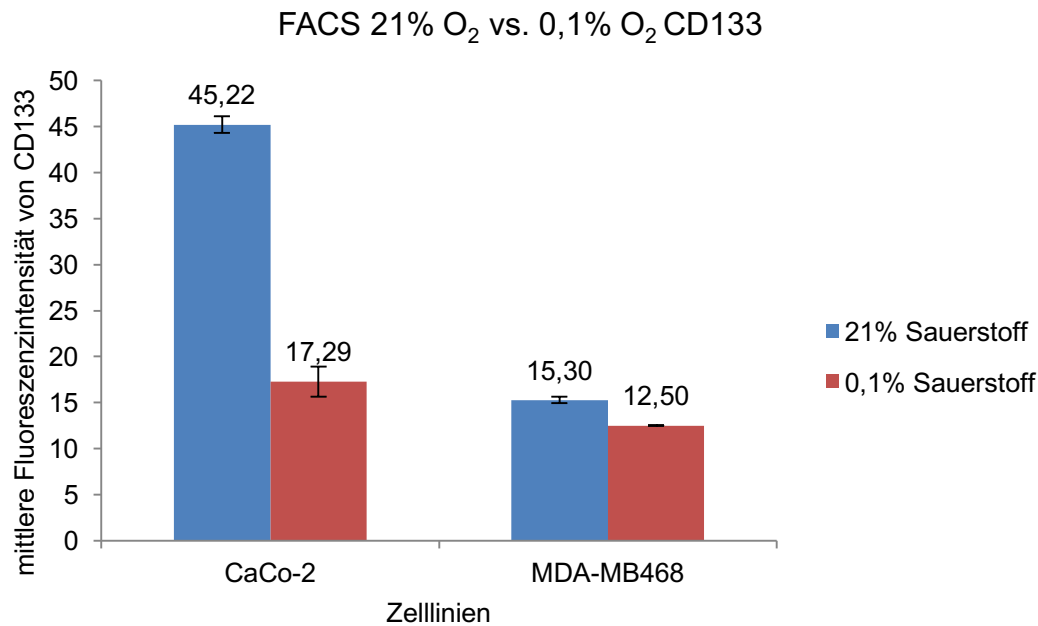


Abbildung 4.9: Durchflusszytometrisch gemessene CD133 Expression der Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 21% O₂ und 0,1% O₂. Gezeigt sind die Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.1.3 Veränderungen von CD133 und potentieller Zielgene unter Hypoxie auf RNA-Ebene

Nachdem die hypoxischen Zellen nach 9 Tagen auf ihre Zellmorphologie, ihre Proliferation und die Proteinexpression von CD133 untersucht worden waren (siehe 4.3.1.1 und 4.3.2.2), sollte im Anschluss auch die relative Expression von CD133 mRNA mittels qRT-PCR gemessen werden. Interessant war im vor allem die Frage, ob auch die mRNA-Menge für CD133 in den hypoxischen Zellen, wie schon für die Oberflächenproteinmenge im vorherigen Abschnitt dargestellt, reduziert ist. Hierfür wurde mit der gewonnenen mRNA nach Umschreibung in cDNA eine Realtime RT-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden auch möglicherweise durch CD133 regulierte Zielgene mit untersucht. Ausgewählt wurden für dieses Experiment BACE2, BAI3 und GATA2. Dadurch konnten sowohl ein Transkriptionsfaktor und ein Gen für den Metabolismus der Zelle als auch ein Gen für die Proliferation bestimmt werden. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die CD133 RNA-Menge bei 0,1% Sauerstoff in beiden Zelllinien steigt, signifikant vor allem bei CaCo-2. Dies steht im Gegensatz zu dem durchflusszytometrisch gemessenen Rückgang von CD133 auf der Zellmembran bei Hypoxie wie in 4.3.1.2 mittels Durchflusszytometrie gezeigt.

4.3.1.3.1 qRT-PCR von CD133 und potentieller Zielgene unter Hypoxie mit Gesamt-RNA der Zelllinie CaCo-2

Zuerst wurde die Zelllinie CaCo-2 auf die relative Expression von CD133 sowie der potentiellen Zielgene BACE2, BAI3 und GATA2 bei der hypoxischen Subpopulation und der Kontroll-Subpopulation untersucht. Abbildung 4.10 zeigt grafisch die Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs.

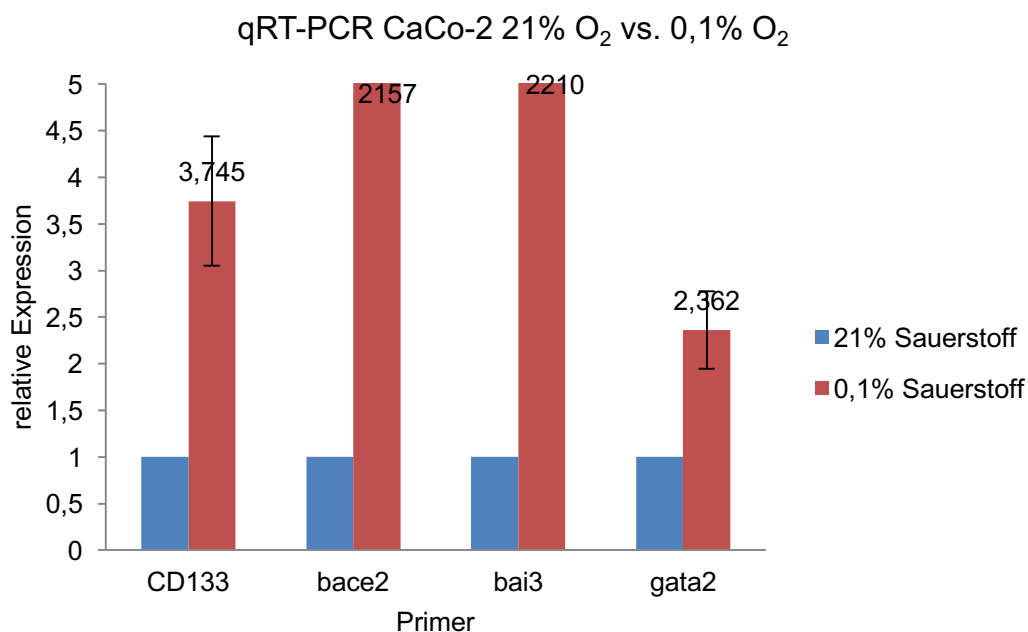


Abbildung 4.10: qRT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinie CaCo-2 für CD133 und die potentiellen Zielgene. Untersucht wurden BACE2, BAI3 und GATA2 unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (0,1% O₂). Gezeigt sind die Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Zelllinie CaCo-2 steigt wie erwartet die RNA-Menge für BACE2 und GATA2 bei einer um das 3,8-fach erhöhten relativen Expression von CD133 nach 9 Tagen Hypoxie. Bei BAI3 ist sie überraschenderweise im Gegensatz zu den Daten im Microarray und den vorangehenden Versuchen bei Zelllinien mit starker CD133-Expression heraufreguliert.

4.3.1.3.2 qRT-PCR von CD133 und potentieller Zielgene unter Hypoxie mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468

Nun wurde bei der Zelllinie MDA-MB468 mittels qRT-PCR die relative mRNA Expression von CD133 sowie der potentiellen Zielgene BACE2, BAI3 und GA-

TA2 gemessen. Dies erfolgte einerseits bei der Subpopulation, die 9 Tage lang unter Hypoxie inkubiert worden war und andererseits bei der Kontrollgruppe. Abbildung 4.11 veranschaulicht die Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCRs.

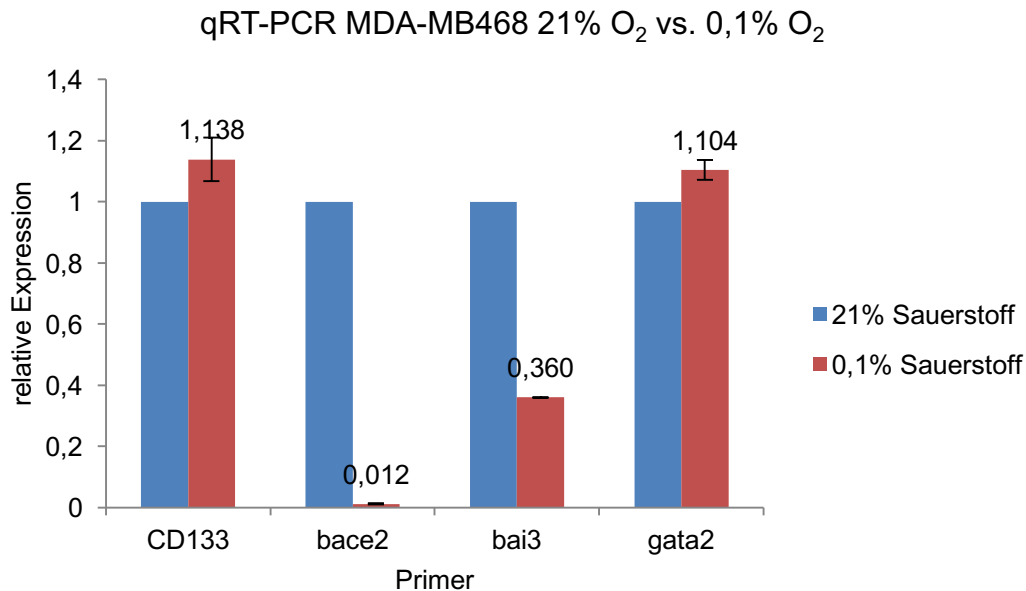


Abbildung 4.11: qRT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinie MDA-MB468 für CD133 und die abhängigen Zielgene. Untersucht wurden BACE2, BAI3 und GATA2 unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (0,1% O₂). Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Effekt einer Veränderung der CD133-Expression ist bei der Zelllinie MDA-MB468 nur sehr gering ausgeprägt. Die hypoxische Subpopulation zeigt eine statistisch nicht relevante Erhöhung der relativen Expression von CD133 auf 114%. Die Expression der mRNA-Menge für das Gen BAI3 geht unter Hypoxie stark zurück und zeigt einen Wert von 40%. In den Microarray-Daten zeigt sich bei einer Heraufregulation von CD133 eine Suppression von BAI3 auf 50%. Die stark gesteigerte CD133-Expression fehlt unter Hypoxie im Gegensatz zu den Microarray-Ergebnissen jedoch. Für GATA2 ist eine leichte, ebenfalls statistisch nicht relevante Erhöhung der mRNA-Expression auf einen Wert von 110% messbar. Die Microarray-Auswertung zeigt für GATA2 eine gleichsinnige Regulation, jedoch wiederum bei viel stärkerer Expressionserhöhung von CD133. Die mRNA von BACE2 unter Hypoxie ist gegenläufig reguliert, da die relative Expression bei steigender CD133 mRNA nicht erhöht ist.

4.3.2 Die Auswirkung von Nährstoffentzug (1%FCS) auf verschiedene Zelllinien *in vitro*

Nachfolgend wurde in einem neuen Experiment ein Teil der Zellen durch Entzug von FCS unter Zellstress gesetzt. Das heißt einer Hälfte der Zellen wurde nach Adhäsion an den Flaschenboden das konventionelle Nährmedium mit 10% FCS entzogen und durch ein Nährmedium mit 1% FCS ersetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen über mehrere Tage bei üblichen Sauerstoffbedingungen, d.h. bei 21% O₂, inkubiert. Nach drei und nochmals nach fünf Tagen wurde der Versuch ausgewertet. Die andere Hälfte der Zellen hatte während dieser Zeit Standard-Nährstoffbedingungen. Verwendet wurden dieses Mal ebenfalls wieder nur die endogen CD133-exprimierenden Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468.

4.3.2.1 Proliferation und Zellmorphologie verschiedener Zelllinien unter Nährstoffentzug

Zuerst wurde das Wachstumsverhalten nach drei und nach fünf Tagen durch das Aussehen unter dem Mikroskop bewertet und durch Zählung der vitalen Zellen beider Versuchsgruppen verglichen. Die folgenden Abbildungen 4.12 und 4.13 zeigen die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe der beiden Zelllinien CaCo-2 bzw. MDA-MB468 im jeweils gleichen Maßstab nach fünf Tagen unter dem Mikroskop fotografiert.

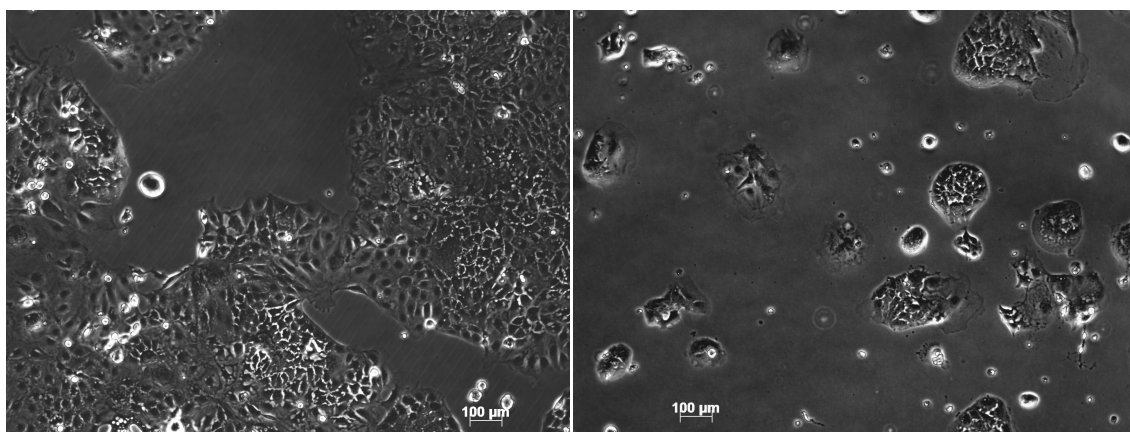


Abbildung 4.12: CaCo-2 nach 5 Tagen bei 10% FCS links und unter Nährstoffentzug bei 1% FCS rechts im Bild.

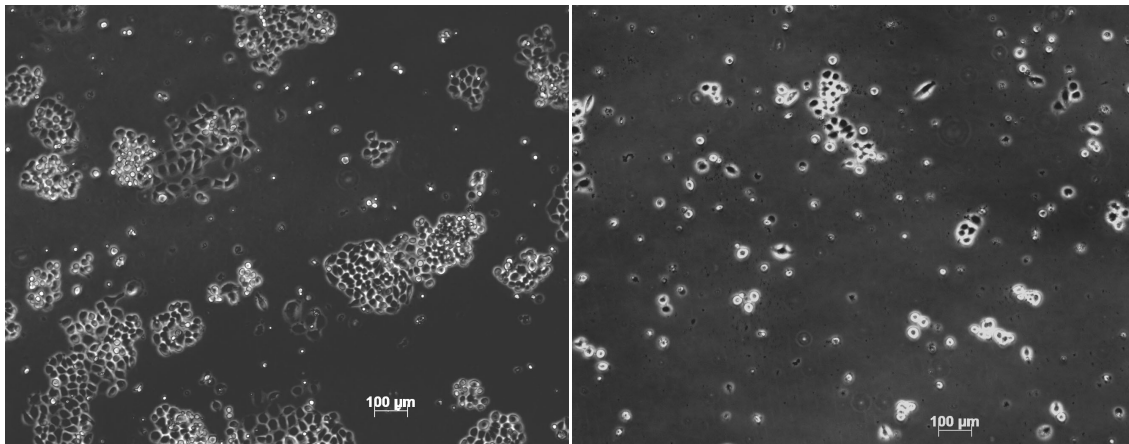


Abbildung 4.13: MDA-MB469 nach 5 Tagen bei 10% FCS links und unter Nährstoffentzug bei 1% FCS rechts im Bild.

Morphologisch verhielten sich die beiden untersuchten Zelllinien unter Zellstress durch Nährstoffentzug ähnlich wie unter hypoxischen Bedingungen: Die Zelladhäsion an die Kulturschale war verringerter bei verkleinerter Zelloberfläche und die Zellen erschienen dichter aneinandergedrängt, d.h. expandierten nicht so stark. Die Proliferation war ebenfalls ähnlich stark eingeschränkt. Für die Auswertung wurde jeweils die Gesamtzellzahl der geernteten Zellen angegeben.

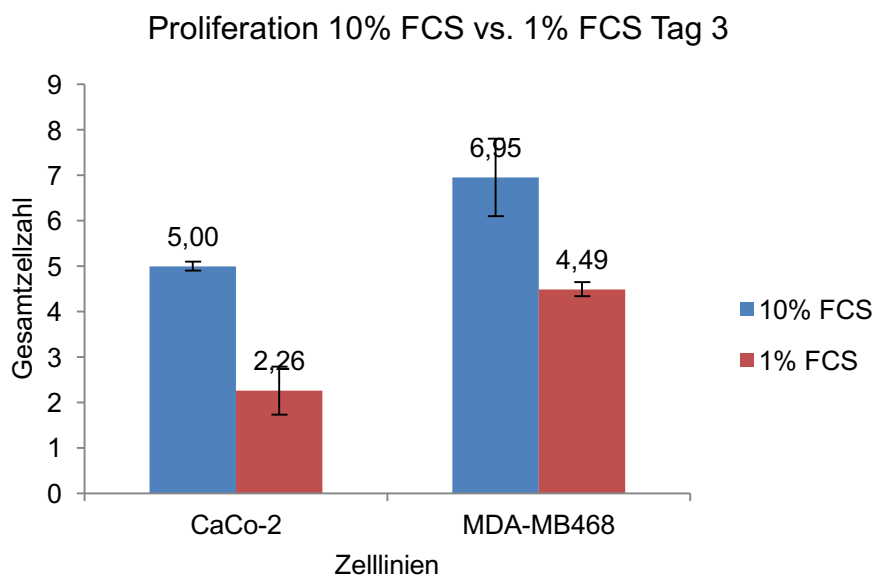


Abbildung 4.14: Proliferation von den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 nach drei Tagen bei 10% FCS und 1%FCS. Abgebildet sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 4.14 zeigt grafisch die Proliferation der Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 nachdem die Zellen drei Tage mit 10%igem bzw. 1%igem FCS inkubiert worden waren. Schon nach drei Tagen ist ein signifikanter Unterschied der Zellen im Wachstum auszumachen. Bei CaCo-2 ist die Proliferation auf 45% (2,26:5), d.h. weniger als die Hälfte reduziert. Bei der Zelllinie MDA-MB468 ist dieser Unterschied mit einer Einschränkung der Proliferation auf 65% (4,49:6,95) geringer.

Der gleiche Versuch wurde nach fünf Tagen Inkubationszeit nochmals wiederholt. Abbildung 4.15 zeigt die Auswertung der Proliferation nach fünf Tagen bei Nährstoffbedingungen von 10% bzw. 1% FCS von drei unabhängigen Experimenten.

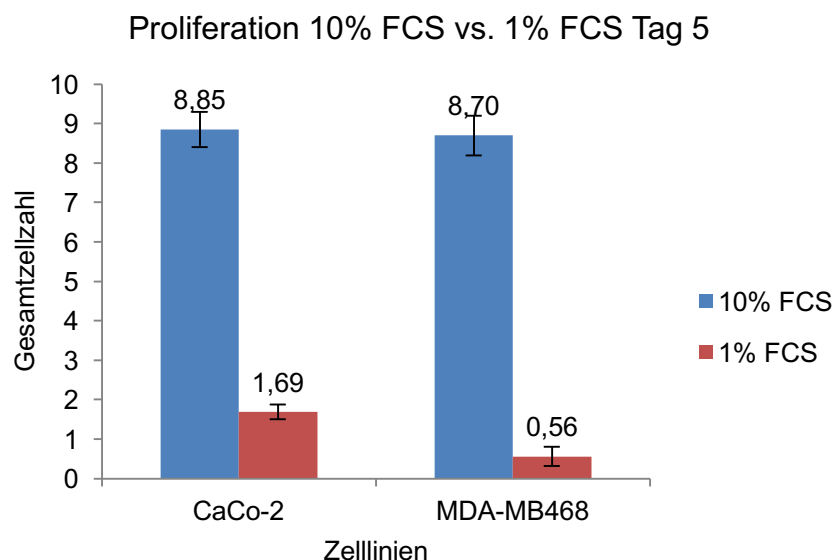


Abbildung 4.15: Proliferation von den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 nach 5 Tagen bei 10% FCS und 1%FCS. Abgebildet sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

Gut zu erkennen ist unter verminderten Nährstoffbedingungen ein stark verringertes Wachstum, das nach fünf Tagen noch stärker ausgeprägt ist, als nach drei, da die Zellen mit 10% FCS zwischen Tag drei und Tag fünf noch mehr Zeit haben, sich mit jeder Teilung zu verdoppeln und bei den nährstoffentzogenen Zellen die Reserven für mögliche Zellteilungen weiter schrumpfen. Bei der Zelllinie CaCo-2 verringerte sich die Proliferation nach fünf Tagen unter 1% FCS

auf 19% (1,69:8,85). Bei der Zelllinie MDA-MB468 war die Proliferation im Vergleich zur Kontroll-Subpopulation sogar auf nur 6% (0,56:8,7) gesunken.

4.3.2.2 Durchflusszytometrische Expression von CD133 unter Nährstoffentzug

Nun wurde die Expression von CD133 an der Plasmamembran mittels Durchflusszytometrie bei beiden Versuchsgruppen bestimmt. Die Werte wurden dabei wieder auf die Expression von MHC1 normiert, die ebenfalls wie in 4.3.1.2 unter Hypoxie gezeigt, eine Herunterregulation zeigte. Abbildung 4.16 veranschaulicht grafisch die Auswertung der Expression von CD133 bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 mittels Durchflusszytometrie nach drei Tagen bei Nährstoffbedingungen von 10% bzw. 1% FCS.

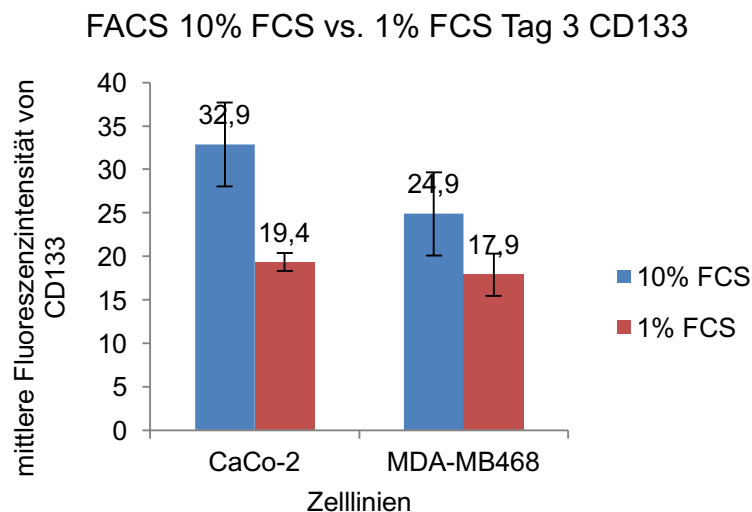


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 10% FCS und 1% FCS nach drei Tagen. Gezeigt sind die Mittelwerte und jeweilige Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Wie schon bei dem Experiment der CD133-Expression unter Hypoxie gezeigt (siehe 4.3.1.2), ist die mittlere Fluoreszenzintensität von CD133 bei der Zelllinie MDA-MB468 bei der Kontroll-Subpopulation (10% FCS) geringer als die Intensität für CD133 bei der Zelllinie CaCo-2. Bei dem Hypoxie-Experiment waren es für die Zelllinie MDA-MB468 34% im Vergleich zur Zelllinie CaCo-2 (15,3:45,22). Bei dem hier gezeigten Versuch unter Nährstoffentzug sind es 76% (24,9:32,9) für die CD133-Expression bei den MDA-MB468 Zellen in der

Kontroll-Subpopulation verglichen mit der Kontrolle der CaCo-2 Zellen. Nach drei Tagen ist bereits ein Rückgang der CD133-Expression auf der Membranoberfläche bei verringerter Nährstoffzufuhr auszumachen. Bei CaCo-2 ist diese Herunterregulation von CD133 auf der Membranoberfläche auf einen Wert von 60% (19,4:32,9) etwas stärker als bei der Zelllinie MDA-MB468 mit einer Reduktion auf 70% (17,9:24,9).

Nachfolgend wurde die gleiche durchflusszytometrische Untersuchung nach fünf Tagen Inkubationszeit unter Nährstoffbedingungen von 10% bzw. 1% FCS für die beiden Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 wiederholt. Abbildung 4.17 zeigt die Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 von drei unabhängigen Experimenten.

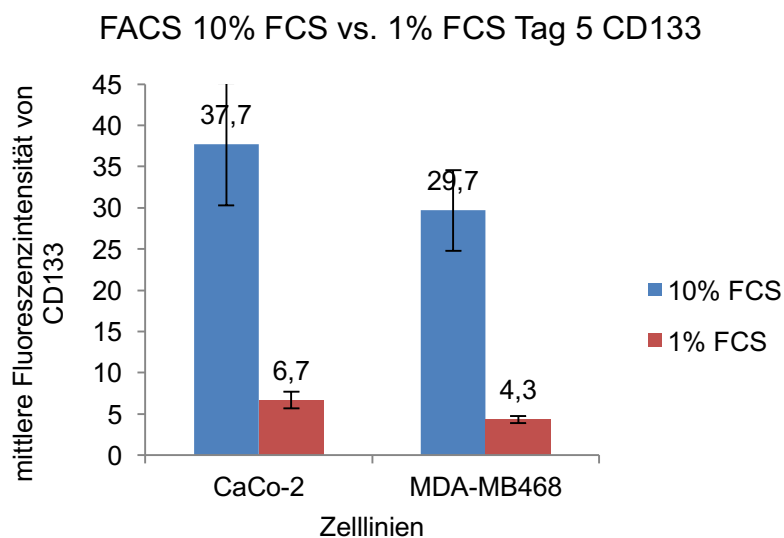


Abbildung 4.17: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD133 bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 bei 10% FCS und 1% FCS nach fünf Tagen. Gezeigt sind die Mittelwerte und jeweilige Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Differenz der relativen Expression von CD133 bei beiden Kontroll-Subpopulationen (10% FCS) zeigte nach fünf Tagen einen annähernd identischen Wert wie nach drei Tagen: Die Zelllinie MDA-MB468 zeigte im Vergleich mit der Zelllinie CaCo-2 eine CD133-Expression von 78% (29,7:37,7). Nach drei Tagen lag der Wert bei 76%. Der Unterschied der CD133-Expression auf der Zelloberfläche wurde nach fünf Tagen Inkubation unter 1% FCS im Vergleich

zur CD133-Expression bei 10% FCS bei beiden Zelllinien nochmals deutlich größer: Die Zellen ohne ausreichende Nährstoffbedingungen exprimieren um ein Vielfaches weniger CD133 an der Zelloberfläche im Vergleich zu den Zellen, die unter konventionellen Bedingungen für fünf Tage inkubiert worden waren. Für die Zelllinie CaCo-2 zeigte sich eine Herunterregulation der CD133-Expression nach fünf Tagen Nährstoffentzug auf einen Wert von 20% (6,7:37,7). Bei der Zelllinie MDA-MB468 war die Herunterregulation von CD133 auf der Zelloberfläche bei 1% FCS mit einem Wert von 10% (4,3:29,7) sogar noch größer.

4.4 Einfluss von TGF β auf die Zelldifferenzierung

Durch die Zugabe von TGF β (transforming growth factor β) *in vitro* kann eine EMT (epithelial-mesenchymale Transition) induziert werden. Das heißt Zellen verlieren ihre Polarität und können die Fähigkeit zur Migration erlangen. Dies ist eine Eigenschaft von Zellen, welche die Disseminierung und Metastasierung von karzinogenen Zellen *in vivo* begünstigt. Für folgendes Experiment wurde ausschließlich die Tumorzelllinie CaCo-2 genutzt. Die Auswertung erfolgte 48 und 72 Stunden nach Zugabe von TGF β , welchem die Hälfte der Zellen ausgesetzt war. Die andere Hälfte diente als Referenz für normale Proliferation unter konventionellem Medium. Als Kontrollzelllinie diente A549, eine humane pulmonale Adenokarzinom Zelllinie, die nach Zugabe von TGF β innerhalb von 72 Stunden in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften übergeht.

4.4.1 Proliferation und Zellmorphologie durch Zugabe von TGF β

48 Stunden nach Zugabe von TGF β zeigte sich eine um 30% niedrigere Proliferation der CaCo-2 im Vergleich zu kontroll-behandelten Zellen. Nach 72 Stunden war dieser Effekt nicht mehr auszumachen: Diejenigen CaCo-2, die TGF β ausgesetzt waren, proliferierten um 47% mehr.

Zellmorphologisch konnte durch Zugabe von TGF β kaum eine mesenchymale Transition bei CaCo-2 Zellen gezeigt werden. Bei der Kontrollzelllinie A549 war die EMT bereits nach 48 Stunden anhand eines mesenchymalen Phänotyps gut

im Mikroskop erkennbar. Vor Einleitung der EMT bei der Kontrollzelllinie A549 zeigten die Zellen ein kugelförmiges Aussehen und waren kaum an der Zellkulturschale adhären. Nach der Einflussnahme auf die Zelldifferenzierung durch Zugabe von TGF β zeigten die A549 Zellen schon nach 48 Stunden eine Veränderung der Zellmorphologie: Die Zellen nehmen einerseits eine spindel- bis sternförmige, langgestreckte Form an und zeigen andererseits eine größere Adhärenz am Boden der Kulturschale.

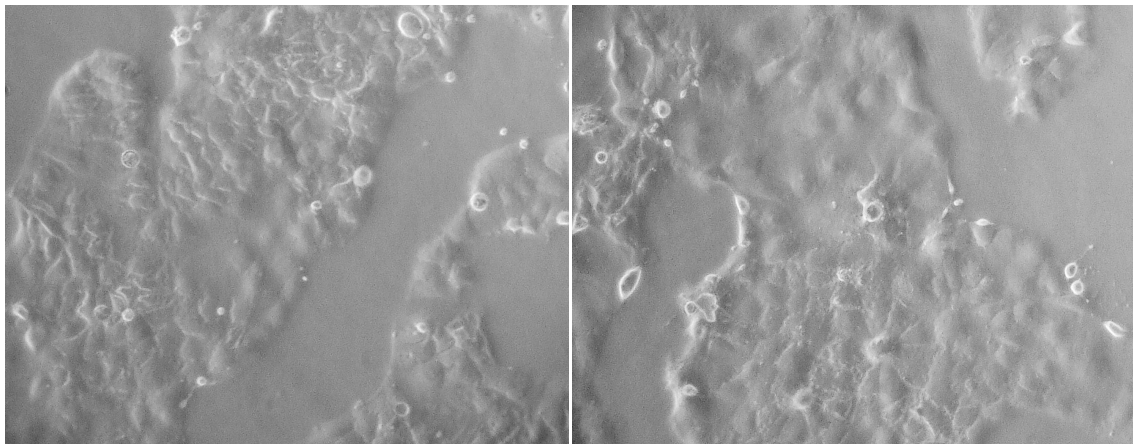


Abbildung 4.18: CaCo-2 nach 48 Stunden. Links zu sehen ist die Kontrolle, rechts diejenigen CaCo-2 nach Zugabe von TGF β .

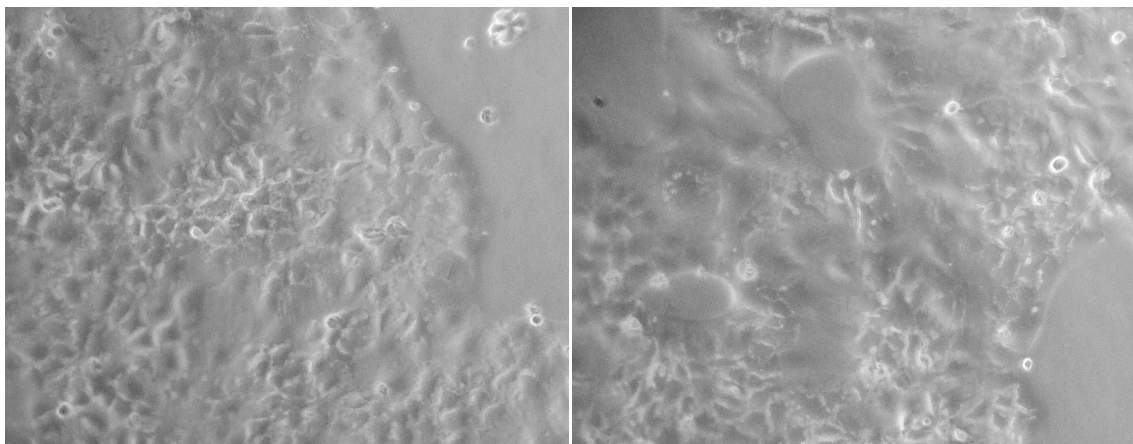


Abbildung 4.19: CaCo-2 nach 72 Stunden. Im linken Bild ist die Kontrolle zu sehen, im rechten die Zellen nach Zugabe von TGF β .

Wie in Abbildung 4.18 und 4.19 dargestellt, konnte eine morphologische Veränderung der Zellen durch Zugabe von TGF β bei der Zelllinie CaCo-2, im Ver-

gleich zur Kontrollzelllinie A549, nicht eindeutig nachgewiesen werden. Nach 48 sowie nach 72 Stunden zeigten die CaCo-2 Zellen nach Zugabe von TGF β angedeutet eine leicht spindelförmigere, länger gestreckte Zellform, zu vereinbaren mit mesenchymalen Zelleigenschaften. Ein anderer Unterschied zu der Kontroll-Subpopulation der CaCo-2 Zellen war eine lockerere Anordnung der Zellen: Die Kolonien waren nicht mehr so dicht gedrängt organisiert, was auf eine Auflösung der Zellkontakte hinweisen könnte. Die Befunde waren jedoch nicht so eindeutig wie für die Kontrollzelllinie A549, für die eine EMT beobachtet wurde.

4.4.2 Durchflusszytometrisch gemessene Expression von CD133 durch Zugabe von TGF β

Im FACS konnte 48 Stunden nach Zugabe von TGF β eine Reduktion des CD133 Oberflächenproteins um 15% im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Dies zeigte keinen signifikanten Unterschied an. Für die Kontrollzelllinie A549 konnte CD133 nicht nachgewiesen werden.

4.4.3 Veränderungen von CD133 auf RNA-Ebene durch Zugabe von TGF β

Mittels qRT-PCR wurde die potentiell durch TGF β hervorgerufene Veränderung von CD133 auf mRNA-Ebene gemessen. Außerdem wurde E-Cadherin als epithelialer sowie N-Cadherin und Vimentin als mesenchymale Marker bestimmt. Die Messung erfolgte 48 und 72 Stunden nach Zugabe von TGF β . Abbildung 4.20 veranschaulicht grafisch die Auswertung der Messergebnisse, die mit Hilfe der qRT-PCR generiert worden waren.

Bereits nach 48 Stunden konnte eine leichte Erhöhung der mesenchymalen Marker auf RNA-Ebene gemessen werden: N-Cadherin zeigte eine Heraufregulation der mRNA auf 1,47 nach Zugabe von TGF β . Die mRNA von Vimentin stieg mit einem Wert von 1,34 in der qRT-PCR ebenfalls an. Die relative Expression von CD133 zeigte sich mit einem Wert von 1,07 nach Zugabe von TGF β nahezu unverändert, ebenso von E-Cadherin (0,98 als Wert für die relative Expression in der Versuchs-Subpopulation).

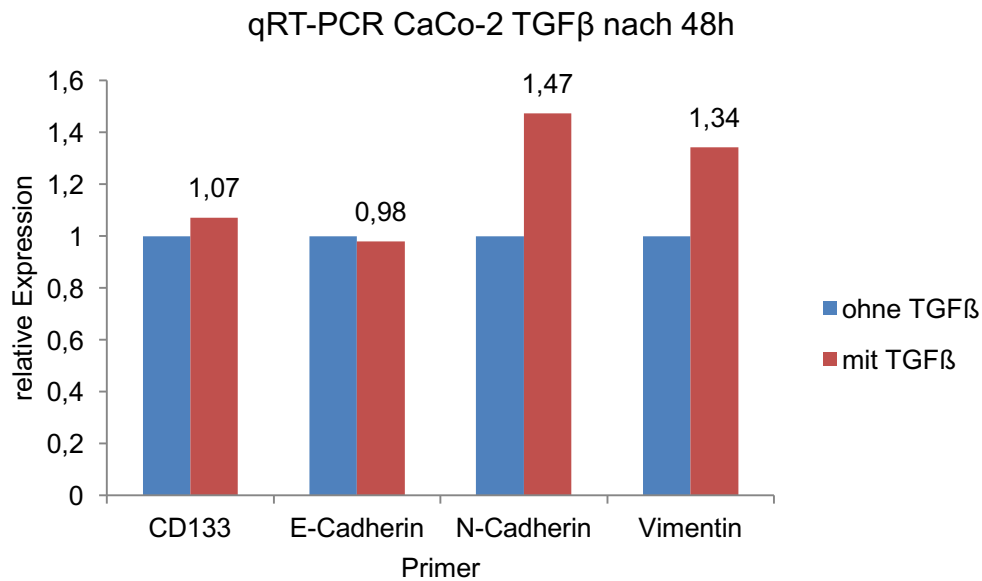


Abbildung 4.20: qRT-PCR der Zelllinie CaCo-2 für die relative Expression der mRNA von CD133, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin nach 48 Stunden ohne und mit Zugabe von TGF β .

Die Kontrollzelllinie A549 exprimiert kein CD133 und zeigte nach 48 Stunden eine viel stärkere Regulation E-Cadherin als die Zelllinie CaCo-2 mit einem fast vollständigen Rückgang von sowie einer vielfachen Erhöhung von N-Cadherin und Vimentin. E-Cadherin als epithelialer Marker verzeichnete dabei eine Herunterregulation auf 0,04 im Vergleich zur Kontroll-Subpopulation. Die mesenchymalen Marker waren stark heraufreguliert: Die mRNA von N-Cadherin war mit einem Wert von 7,6 noch stärker angestiegen als die von Vimentin (4,4-fache Erhöhung verglichen mit der Kontrollgruppe). Dies zeigte bereits nach zwei Tagen eine fast abgeschlossene EMT.

Das Experiment wurde 72 Stunden nach TGF β Zugabe für die Zelllinie CaCo-2 mittels qRT-PCR erneut durchgeführt und anschließend ausgewertet. Abbildung 4.21 veranschaulicht grafisch die Ergebnisse der relativen Expression von CD133 mRNA, sowie der untersuchten EMT-Marker.

Nachdem CaCo-2 Zellen für 72 Stunden TGF β ausgesetzt waren, konnte eine Erhöhung der mRNA von CD133 um 35% gemessen werden. Der mesenchymale Marker N-Cadherin war mit einem Wert von 1,40 nach 72 Stunden fast identisch heraufreguliert wie bereits nach 48 Stunden (1,47). Vimentin als zweiter mesenchymaler Marker zeigte eine vorangeschrittene EMT durch eine wei-

tere Erhöhung der relativen Expression auf 1,61. Nach 48 Stunden lag die Regulation noch bei 1,34. E-Cadherin zeigte nicht wie erwartet eine Herunterregulation, sondern im Gegenteil eine Erhöhung der mRNA auf einen Wert von 1,39. Da die Werte nicht um ein Vielfaches verändert waren wie bei der Kontrollzelllinie A549 und zum Teil sogar gegensinnig reguliert waren wie für den epithelialen Marker E-Cadherin, konnte eine EMT für die Zelllinie CaCo-2 nicht nachgewiesen werden und weitere Experimente wurden aus diesen Gründen nicht durchgeführt.

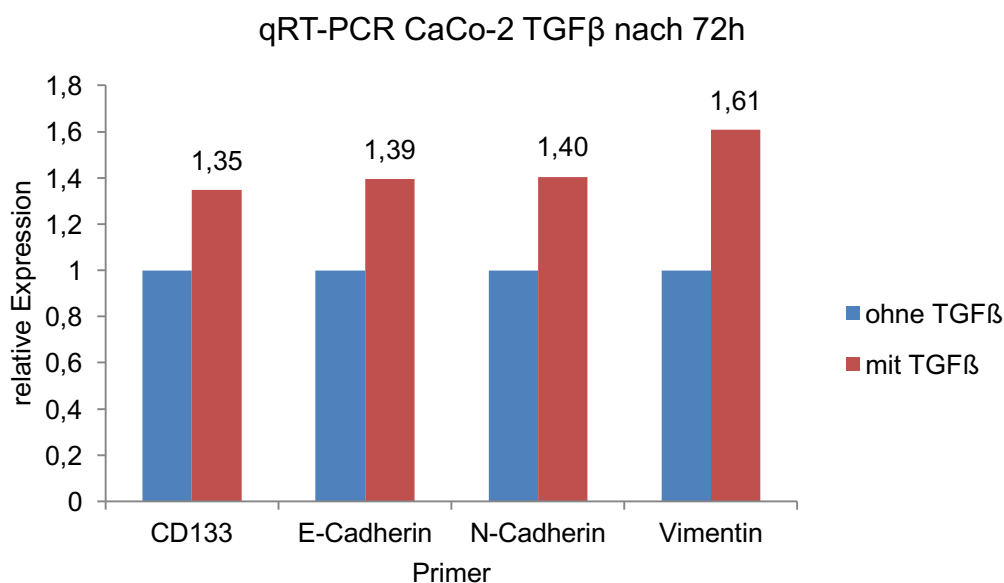


Abbildung 4.21: qRT-PCR der Zelllinie CaCo-2 für die relative Expression der mRNA von CD133, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin nach 72 Stunden ohne und mit Zugabe von TGFβ.

4.5 *In-vitro* verankerungsunabhängiges Wachstum mit Kolonienbildung

Mittels eines Soft Agarose Assays sollte herausgefunden werden inwiefern die Zellen ohne Verankerung wachsen und Kolonien bilden können. Dies ist ein *in vitro* Modell, um die Aggressivität einzelner Tumorzelllinien näher untersuchen zu können. Interessant ist dieses Experiment vor allem auch, da das *in vivo* Wachstum von Tumoren ebenfalls aggressive Zelleigenschaften benötigt. Für diesen Versuch wurde ein halbfestes Medium in zwei Schichten mit unterschiedlichem Agargehalt pipettiert. Untersucht wurde zum einen die Zelllinie

HEK293 CD133^{-/+} angereichert und zum anderen die Zelllinie MDA-MB468. Die Fragestellung des Versuchs war sowohl, ob CD133 einen Einfluss auf eine verstärkte Kolonienbildung hat, als auch, ob CD133-exprimierende Zellen ein verstärktes Wachstum zeigen. Zum einen konnte im direkten Vergleich zwischen den beiden Subpopulationen der HEK293 Zellen untersucht werden, ob durch die Expression von CD133 ein Unterschied in der Bildung der Anzahl von Kolonien besteht, d.h. ob HEK293 CD133⁺ angereichert mehr Kolonien bildet. Zum anderen sollte auch eine endogene CD133-exprimierende Zelllinie (MDA-MB468) auf ihr verankerungsunabhängiges Wachstum *in vitro* genauer analysiert werden.

4.5.1 *In vitro* verankerungsunabhängiges Wachstum der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert

Die Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert wurde in unterschiedlicher Zellzahl (1000 Zellen/24-well und 2000 Zellen/24-well) ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien morphologisch begutachtet, gezählt und Mittelwerte gebildet. Abbildung 4.22 zeigt fotografisch das verankerungsunabhängige Wachstum der HEK293 CD133⁻ bzw. ⁺ angereicherten Subpopulation nach einer Ausplattierung von 1000 Zellen nach 10 Tagen. In Abbildung 4.23 sind die gleichen Subpopulationen nach 10 Tagen bei einer Ausplattierung von 2000 Zellen im selben Maßstab durch das Mikroskop fotografiert.

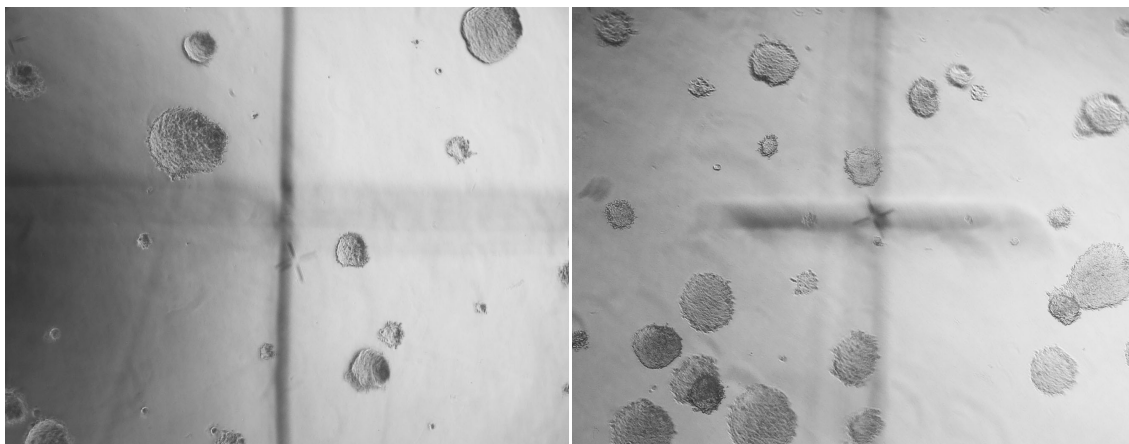


Abbildung 4.22: Links im Bild HEK293 CD133⁻ angereichert nach 10 Tagen bei 1000 ausplattierten Zellen, rechts im Bild das Gleiche für HEK293 CD133⁺ angereichert.

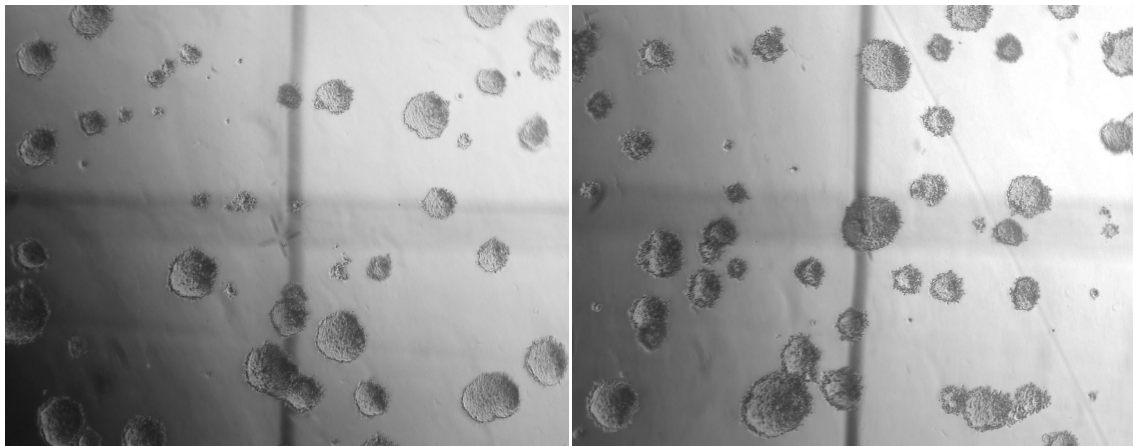


Abbildung 4.23: Links im Bild HEK293 CD133⁻ angereichert nach 10 Tagen bei 2000 ausplattierten Zellen, rechts im Bild das Gleiche für HEK293 CD133⁺ angereichert.

Nachdem die Kolonien am Bildschirm mit Hilfe eines Rasters ausgezählt worden waren, Mittelwerte gebildet wurden und das Experiment drei Mal durchgeführt worden war, konnte die nun folgende Auswertung (siehe Abbildung 4.24) erstellt werden.

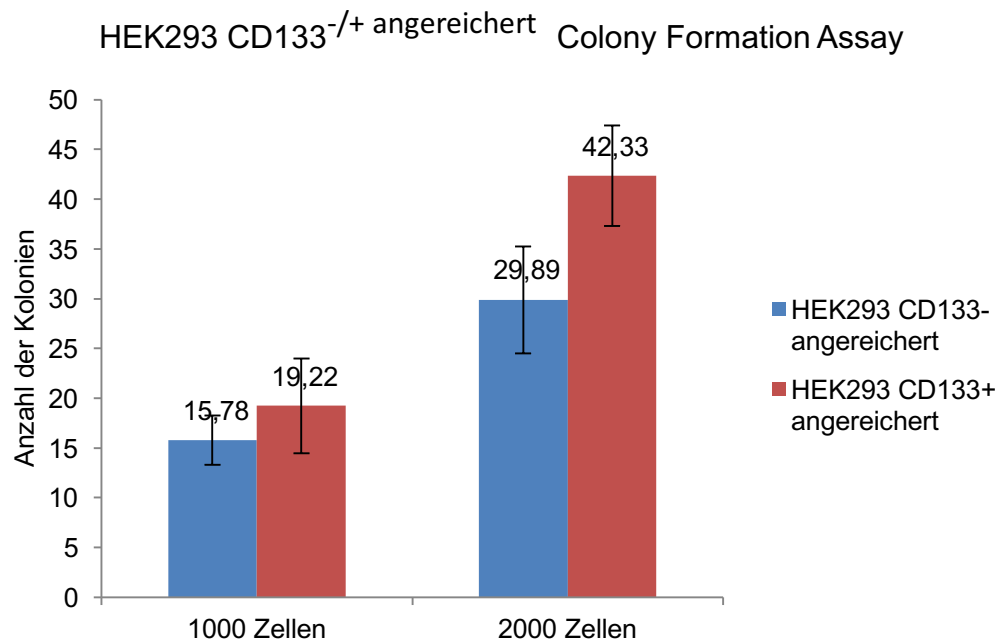


Abbildung 4.24: Auswertung der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert im Colony Formation Assay nach 10 Tagen. Gezeigt sind die Mittelwerte und jeweilige Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Bei einer Ausplattierung von 1000 Zellen pro 24-well zeigte sich bei der Subpopulation HEK293 CD133⁺ angereichert nach 10 Tagen eine leicht gesteigerte Kolonienbildung (19) als bei den HEK293 CD133⁻ angereichert (16). Noch deutlicher war der Unterschied der Anzahl an Kolonien bei einer Ausplattierung von 2000 Zellen pro 24-well: Die CD133⁺ angereicherten HEK293 bildeten im Mittelwert 42 Kolonien, die Subpopulation HEK293 CD133⁻ angereichert nur 30. Dies bedeutet eine um 40% gesteigerte Kolonienbildung bei den CD133-exprimierenden HEK293 Zellen (42:30).

4.5.2 *In vitro* verankerungsunabhängiges Wachstum der Zelllinie MDA-MB468

Bei der endogen CD133-exprimierenden Zelllinie MDA-MB468 konnte ebenfalls eine starke Kolonienbildung gezeigt werden. Leider gab es keine Referenz, da eine stabile Transfektion von MDA-MB468 mit shRNA mehrmals erfolglos blieb und die zweimalige Transfektion mit siRNA gegen CD133 für das 10 Tage dauernde Experiment nicht suffizient genug gewesen wäre. Für dieses Experiment wurden 5000 Zellen/24-well ausplattiert. Abbildung 4.25 zeigt fotografisch die Bildung von Kolonien im Colony Formation Assay bei der Zelllinie MDA-MB468 nach 10 Tagen unter dem Mikroskop.



Abbildung 4.25: MDA-MB468 im Colony Formation Assay im 24-well nach 10 Tagen bei 5000 ausplattierten Zellen.

Bei der Auszählung zeigte sich eine durchschnittliche Kolonienbildung von 42 pro 24-well, was in etwa der Zahl der HEK293 CD133⁺ angereichert Kolonien-

Bildung bei einer Ausplattierung von 2000 Zellen pro 24-well entspricht. Die gleiche Anzahl an gebildeten Kolonien bei unterschiedlicher Zellzahl für die Ausplattierung zu Beginn des Experiments kann auf verschiedene Ursachen hinweisen: Einerseits hatte sich im Vorversuch gezeigt, dass MDA-MB468 eine höhere Zellzahl zu Beginn benötigt, um überhaupt Kolonien bilden zu können. Morphologisch zeigt diese Zelllinie aber auch kleinere kugeligere Zellen mit einem geringeren Zelldurchmesser, was auf den Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zu HEK293 CD133^{-/+} angereichert am Anfang des Experiments hinweisen könnte. Andererseits könnte es auch sein, dass die Zelllinie MDA-MB468 eine schlechtere Kapazität zur Kolonienbildung im Vergleich zu HEK293 aufweist. Eine bessere Vergleichbarkeit wäre für zukünftige *in vitro* Experimente durch eine Subpopulation von MDA-MB468, die kein bzw. kaum CD133 exprimiert, gegeben.

4.6 *In-vitro* Gewebeinvasion im Sphäroid-Modell

In vivo konnte anhand eines Mausmodells gezeigt werden, dass das Tumorstadium zwischen HEK293 CD133^{-/+} angereichert differiert. *In vivo* bilden HEK293 CD133⁺ angereichert größere Tumoren. Nun stellte sich auch die Frage, ob sich die Gewebeinvasion der CD133-positiven Tumorzellen aggressiver verhält. Interessant war nun das Verhalten der zwei verschiedenen Zelllinien *in vitro* in Bezug auf die Expression bzw. das Fehlen von CD133. Dies konnte durch ein Sphäroid-Modell untersucht werden. Dabei wurden im ersten Schritt getrennt Fibroblasten-Sphäroide und Sphäroide von HEK293 CD133⁻ und ⁺ angereichert gebildet. Im zweiten Schritt am nächsten Tag wurden die Fibroblasten-Sphäroide mit jeweils einem HEK293 CD133⁻ angereichert bzw. CD133⁺ angereichert Sphäroid zusammengebracht, um an den darauffolgenden Tagen die Invasivität der HEK293 Zellen in das Fibroblasten-Sphäroid beurteilen zu können.

4.6.1 Bildung von Kolonien bei HEK293 CD133^{-/+} angereicherten Zellen

Sowohl die HEK293 CD133⁻ angereicherte als auch die CD133⁺ angereicherte Subpopulation bildet einen Tag nach dem Ausplattieren auf 1% Agarose stabile Sphäroi-

de. Dabei hat sich eine Zellzahl von 30000 pro 96-well für das weitere Experiment als geeignet herausgestellt.

4.6.2 Invasion eines Fibroblastenzellverbundes durch HEK293 CD133^{-/+} angereichert

Nachdem nun ein stabiles Fibroblasten-Sphäroid, ebenfalls aus 30000 Zellen bestehend, mit jeweils einem HEK293 CD133⁻ bzw. CD133⁺ Sphäroid zusammengebracht wurde, konnte nach 72 Stunden eine Invasion der HEK293 Zellen in den Fibroblastenzellverbund beobachtet werden. Abbildung 4.26 zeigt die *in vitro* Gewebeinvasion sowohl der CD133⁻ angereicherten als auch der CD133⁺ angereicherten HEK293 Zellen fotografisch im gleichen Maßstab unter dem Mikroskop.

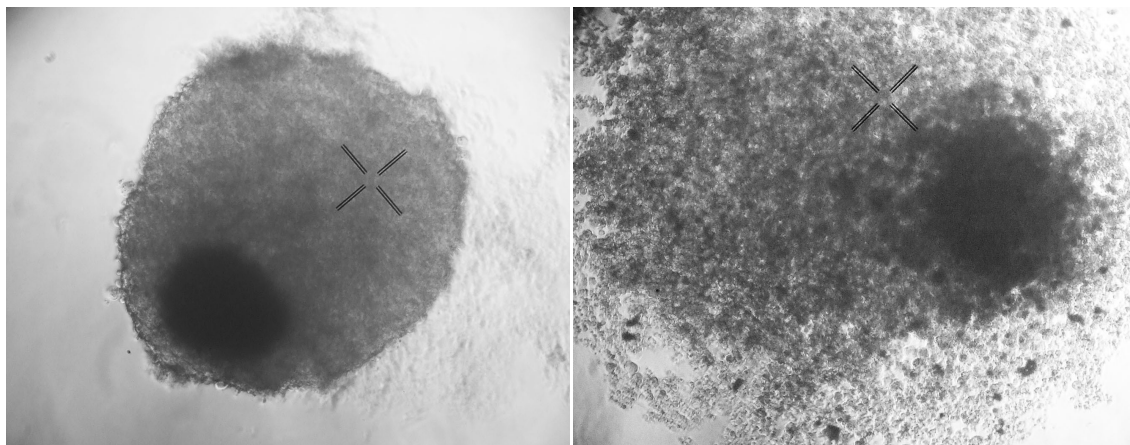


Abbildung 4.26: Invasion eines Fibroblastenzellverbundes nach 72 Stunden durch HEK293 CD133⁻ angereichert links im Bild und durch HEK293 CD133⁺ angereichert rechts.

Gut zu erkennen ist der dichte Zellverbund bei HEK293 CD133⁻ angereichert, der langsam das Fibroblasten-Sphäroid umwächst, dabei aber den engen Zellkontakt untereinander nicht aufgibt. Bei HEK293 CD133⁺ angereichert sind dagegen eine Auflösung der engen Zellkontakte untereinander und eine Invasion in den Fibroblastenzellverbund zu sehen. Die Zellen verteilen sich auf eine viel größere Fläche, sind locker angeordnet und erscheinen invasiver. Außerdem wirkt das Fibroblasten-Sphäroid vor allem am Rand aufgelockerter, als ob die Zell-Zell-Kontakte verloren gehen würden.

Da diese Sphäroide zu fragil waren, gelang es leider nicht sie histologisch aufzuarbeiten. Vor allem die HEK293 CD133⁺ angereichert Sphäroide waren wie in

Abbildung 4.36 rechts zu erkennen, zu lose und zerfallen, um sie zu ernten und zu kryokonservieren. Dabei könnte in Zukunft die Invasivität der Tumorzellen in den Fibroblastenzellverbund weiter beschrieben werden und die Verteilung der CD133-Expression in den HEK293 Zellen genauer detektiert werden.

5 Diskussion

1997 konnte erstmals gezeigt werden, dass hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen das membranassoziierte Protein CD133 exprimieren. Schon damals ging man davon aus, dass CD133 ein wichtiger früher Marker für Stammzellen sein könnte (Miraglia *et al.* 1997). Seitdem ist dieses Oberflächenprotein immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt. Kurze Zeit später wurde entdeckt, dass CD133 auch auf verschiedenen anderen embryonalen sowie adulten Epithelzellen exprimiert wird und vorzugsweise in Mikrovilli und Membranprotrusionen lokalisiert ist. Dabei interagiert CD133 mit Cholesterol in der Membran. Daraus wurde geschlossen, dass CD133 für Zell-Zell-Interaktionen, die Bildung von Fortsätzen der Plasmamembran und die Zusammensetzung sowie Organisation der Lipidmembran eine Rolle spielt (Corbeil *et al.* 2001b). Weitere Funktionen des Proteins sind bis heute auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene noch weithin unbekannt.

Die einzige nachgewiesene essentielle Funktion von CD133 scheint in den retinalen Augenstäbchen vorzuliegen, da ein Ausfall von CD133 im Auge durch eine Mutation im *PROM1* Gen mit dem Krankheitsbild der retinalen Degeneration einhergeht. Ursächlich dafür ist eine Rastermutation im humanen *PROM1* Gen, die zu einem verkürzten Protein führt, welches nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert wird (Corbeil *et al.* 2001b).

Später wurde festgestellt, dass CD133 auch auf differenzierten Tumorzellen exprimiert wird, da nur das AC133-Epitop, nicht jedoch das CD133 Protein während der Differenzierung der Tumorzellen herunterreguliert wird. Die CD133 Promotoraktivität, mRNA, Splicevarianten, Proteinexpression und sogar die Expression von CD133 an der Zelloberfläche verändern sich im Laufe der Zelldifferenzierung nicht. Weil die Detektion von CD133 von der Verwendung geeigneter Antikörper abhängig ist, kann das vorhandene Protein in Abhängigkeit seines Glykosylierungszustandes nicht in jedem Fall nachgewiesen werden. Außerdem verbleibt CD133 durch veränderte Glykosylierung oder Faltung in der Zelle, wird nicht an die Membran transportiert und kann dadurch von Antikörpern nicht detektiert werden (Kemper *et al.* 2010a). Durch Gebrauch eines neuen Antikörpers gegen CD133 (α E2) konnte das Protein auf verschiedenen

humanen, adulten, differenzierten Zellen und auch auf Zellen verschiedener Tumorentitäten detektiert werden (Florek *et al.* 2005).

CD133 wird zudem zur Detektion und Isolierung von TICs in verschiedenartigen Tumoren verwendet. Durch mehrere Untersuchungen wurde gezeigt, dass CD133⁺ selektierte humane Zellen ein besonderes Potential zur Repopulation haben (Yin *et al.* 1997, Kemper *et al.* 2010a). Außerdem sind diese Zellen besonders zur Invasion, Migration, Proliferation und Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen befähigt (Uchida *et al.* 2000, Singh *et al.* 2003). Es wurde beschrieben, dass ausschließlich CD133⁺ TICs zur Tumorentstehung fähig sind, CD133⁻ Tumorzellen, welche den Hauptanteil der Tumormasse stellen, alleine jedoch zu keinem Tumorwachstum führen (O'Brien *et al.* 2007, Horst *et al.* 2008). Andere Autoren behaupten, dass sowohl CD133⁻ als auch CD133⁺ Zellen zum Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* befähigt sind. Die CD133⁻ Zellen bilden dabei sogar noch aggressivere Tumoren (Shmelkov *et al.* 2008). Außerdem wird CD133 auf diesen Kolonkarzinom-Zellen zusammen mit EpCAM, einem weiteren wichtigen Tumorstammzellmarker, exprimiert und sagt als unabhängiger Marker ein schlechteres Überleben für den Patienten (Horst *et al.* 2008, Shmelkov *et al.* 2008) und eine höhere Therapieresistenz voraus (Bao *et al.* 2006). Wiederum andere Arbeitsgruppen behaupten, dass eine erhöhte CD133-Expression nicht mit einer schlechteren Überlebensprognose, sondern mit einem größeren Invasionsvermögen und einer erhöhten Differenzierungsfähigkeit der Tumorzellen einhergeht (Choi *et al.* 2009). Die genaue Funktion und die etwaige Korrelation zu klinischen Parametern von CD133 sind daher noch unklar.

CD133 könnte möglicherweise auch eine bedeutende Rolle in der Neoangiogenese in Tumoren spielen, da Tumoren mit CD133⁺ TICs als Antwort auf hypoxische Bedingungen mit einer Sekretion von VEGF antworten und dadurch besser vaskularisiert sind (Bao *et al.* 2006). Außerdem scheint CD133 auch einen Einfluss auf die EMT zu haben, da das Protein durch Src-Tyrosinkinasen zytoplasmatisch phosphoryliert wird (Boivin *et al.* 2009). Kürzlich konnte für HNO-Tumorzellen gezeigt werden, dass eine Hochregulation von CD133 und des Src-Signalwegs mit einer verstärkten EMT (Chen *et al.* 2011) sowie Reduktion von E-Cadherin und Expression von Vimentin einhergeht (Mandal *et al.* 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Regulationsmechanismen von CD133 und möglicherweise davon abhängiger Zielgene in verschiedenen Zelllinien besser zu verstehen. Es wurden einerseits Zelllinien verwendet, die CD133 endogen exprimieren und andererseits Zellen, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden waren. Untersucht und ausgewertet wurde dafür das Verhalten dieser Zellen unter Zellstress wie Hypoxie oder Nährstoffentzug, die Regulation ausgewählter möglicher Zielgene bei Veränderungen der CD133-Expression, das verankerungsunabhängige Wachstumsverhalten dieser Zellen *in vitro* und das Potential zur Gewebeinvasion *in vitro*. Des Weiteren wurde die Regulation der CD133-Expression bei Einleitung der EMT *in vitro* betrachtet.

5.1 CD133-Expression in verschiedenen Zelllinien

Durchflusszytometrische Analysen nicht-permeabilisierter Zellen wiesen eine membranständige Lokalisation von CD133 auf. Eine Differenzierung in Sublokalisationen innerhalb der Plasmamembran kann durchflusszytometrisch jedoch nicht erfolgen. Es ist aber bekannt, dass CD133 vor allem im Bereich von Protrusionen detektiert werden kann. Auch dass das Protein meist in N-glykosylierter Form nachweisbar ist, konnte unter Verwendung entsprechender Glykosidasen im Western Blot durch das entsprechende Molekulargewicht anhand aller untersuchten Zelllinien überprüft werden. Diese posttranslationale Modifikation konnte bereits mehrmals nachgewiesen werden (Corbeil *et al.* 2000). Die endogen stark CD133-positiven Tumorzelllinien CaCo-2 (kolorektales Adenokarzinom) und MDA-MB468 (Mamma-Adenokarzinom) zeigten im FACS, der RT-PCR und im Western Blot stets eine hohe CD133-Expression. Durch die zweimalige Transfektion dieser Zellen mit einer CD133-siRNA konnte durch RNA-Interferenz die Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erfolgreich auf ein geringes Niveau unterdrückt werden. Dies war bei CaCo-2 (Reduktion auf 9% des Ausgangsniveaus) noch effizienter möglich als bei MDA-MB468 (Reduktion auf 41% des Ausgangsniveaus).

Auf der anderen Seite wurde die etablierte Zelllinie HEK293, humane embryonale Nierenzellen, näher untersucht. Dies ist vor dem Hintergrund interessant, dass HEK293 kein endogenes CD133 exprimieren. Diese Zellen waren vorher

in unserem Labor mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert und stabil unter Neomycin enthaltendem Selektionsmedium kultiviert worden. Im FACS hatte sich eine heterogene CD133-Expression gezeigt und so konnten diese Zellen in zwei Subpopulationen sortiert werden. Die einen zeigten CD133 Negativität (HEK293 CD133⁻ angereichert), die anderen waren stark positiv für CD133 (HEK293 CD133⁺ angereichert). Dies ist insofern interessant, da beide Subpopulationen das Expressionsplasmid tragen, also die gleichen Auswirkungen zu erwarten sind, aber ein Teil der Zellen trotzdem das Gen nicht transkribiert und auch das Protein nicht translatiert. Die Differenz in der Höhe der CD133-Expression für beide Populationen konnte ebenfalls im FACS, in der RT-PCR und im Western Blot erfolgreich nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden sowohl HEK293 Wildtyp Zellen als auch ebenfalls endogen CD133-negative HeLa Zellen (Zervix-Karzinom) mit einem CD133-Expressionsplasmid und einem Leerplasmid als Negativkontrolle transfiziert. Dies ist wichtig, um einen Vergleich der mit einem Leervektor transfizierten HEK293 mit den HEK293 CD133⁻ angereichert ziehen zu können. Da zweite Subpopulation zwar ebenfalls kein CD133 exprimiert, jedoch mit dem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden war, hat das Plasmid auf die Zelleigenschaften sowie Genregulationen eventuell trotzdem Auswirkungen. Außerdem konnte durch Transfektion der HeLa Zellen mit CD133 eine Tumorzelllinie mit den HEK293 Zellen, die ursprünglich nicht aus einem Tumor stammen, verglichen werden.

Obwohl manche Autoren einen Unterschied der CD133-Positivität auf mRNA- und Proteinebene beschreiben, zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung mit dem verwendeten Antikörper (Miltenyi Biotec GmbH) kein Unterschied in der CD133-Expression auf mRNA- und Proteinebene.

Es zeigte sich bei mehrmaliger Wiederholung der Versuche stets das gleiche Expressionsmuster für die verschiedenen Zelllinien, d.h. die Positivität für bzw. das Fehlen von CD133 war stets konstant. Dass nicht jede Zelllinie CD133 exprimiert oder der Grad der Expression zwischen den Tumorzelllinien verschieden ist, konnte anhand verschiedener Tumorentitäten, wie dem Kolonkarzinom, dem Melanom und dem Pankreas-Karzinom bereits mehrfach gezeigt werden (Choi *et al.* 2009, Gonzalez-Herrero *et al.* 2013, Hou *et al.* 2014).

5.2 Regulation ausgewählter Gene bei veränderter CD133-Expression

Um eine Aussage über mögliche Veränderungen der Genregulation bei starker bzw. schwacher CD133-Expression treffen zu können, wurde eine Microarray-Analyse mit HEK293 CD133^{-/+ angereichert} Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass vor allem Gene für Migration, Proliferation, Metabolismus und zelluläre Signalwege sowie Transkriptionsfaktoren reguliert waren. Diese Ergebnisse wurden mittels RT-PCR für unabhängige HEK293 CD133^{-/+ angereicherte} Proben überprüft. Es wurde ein zweifacher Unterschied der CD133-Expression zwischen CD133-positiven und -negativen HEK293 Zellen bestimmt. Bei allen potentiellen Zielgenen mit Ausnahme von RUNX3 konnten die Ergebnisse der Microarray-Analyse bestätigt werden, wenn auch die Höhe der Expressionsregulation zum Teil verschieden war. Bei den Genen BAI3, CNN2, FERMT1, ZNF420, GATA2 und ZNF91 konnten in der RT-PCR annähernd identische Regulationen nachgewiesen werden wie in der Microarray-Analyse. Weiterhin zeigten die Gene BACE2, RBP7 und DUSP5 eine gleichsinnige Regulation, die jedoch numerisch eine doppelt so hohe relative Expression in der RT-PCR im Vergleich mit dem Microarray zeigte. Anders verhielt es sich bei den Genen DECR1, KLF11, CELF2 und SHISA2: Die Regulation der Genexpression war zwar gleichsinnig, jedoch um ein Vielfaches verschieden bezogen auf die relative Expression. Dies könnte daran liegen, dass die konventionelle RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese im Vergleich zur qRT-PCR eine geringere Sensitivität aufweist. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt mittels qRT-PCR die Expression von CD133 und ausgewählter Gene im Transkriptom von HEK293 CD133^{-/+ angereichert} untersucht. Hier zeigten alle untersuchten Gene eine größere Kongruenz zu den Microarray-Ergebnissen, vor allem in der Höhe der Regulation. Die Veränderung in der relativen Expression von CD133 war bei den HEK293 CD133^{+ angereichert} um das 32-fache größer im Vergleich zu den HEK293 CD133^{- angereichert}. Fast identische Ergebnisse zwischen qRT-PCR und Microarray-Analyse konnten bei den Genen BAI3, CNN2 und GATA2 erzielt werden. Einen Unterschied in der Höhe der Regulation um den Faktor 2 zeigten die Gene BACE2, FERMT1, ZNF420 und DUSP5. Bei dem Gen ZNF91 betrug dieser Faktor fast 3. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dies auf va-

lidere Resultate in der qRT-PCR, verglichen mit der konventionellen RT-PCR, hindeutet.

Die Gene CELF2, GATA2, KLF11, RUNX3, ZNF91 und ZNF420 kodieren für Transkriptionsfaktoren, die an der mRNA-Transkription beteiligt sind. BACE2, ein Gen aus der Gruppe Metabolismus und zelluläre Signalwege, kodiert für eine β -Sekretase, die das APP (Amyloid β precursor protein) schneidet, zu erhöhter Abeta Produktion führt und somit zur Entstehung der Alzheimer Erkrankung beiträgt (Farzan *et al.* 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass das Gen für BACE2 auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist und mit dem Down-Syndrom in Verbindung gebracht wird (Mok *et al.* 2014). Eine Erhöhung der β -Sekretase durch eine vermehrte CD133-Expression könnte folglich Einfluss auf zelluläre Signalwege nehmen, die die Entstehung verschiedener Krankheiten begünstigen. BAI3, ein Mitglied der Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Bolliger *et al.* 2011), stellt einen Gehirn-spezifischen Angiogenese Inhibitor dar (Hamoud *et al.* 2014). Da durch eine erhöhte Expression von CD133 eine Herunterregulation für das Gen BAI3 nachgewiesen werden konnte, könnte eine Verstärkung der Angiogenese und somit der Tumorprogression in Verbindung mit den erzielten Ergebnissen stehen. CNN2, ein Aktin-bindendes Protein, das in der Organisation des Zytoskeletts eine Rolle spielt, ist wichtig für die Migration von Endothelzellen und richtige vaskuläre Entwicklung (Tang *et al.* 2006). Da eine Heraufregulation von CD133 mit einer verstärkten CNN2-Expression einhergeht, könnten in Hinblick auf die Karzinogenese Gefäße verstärkt gebildet werden und den Tumor mit Nährstoffen versorgen. DECR1, ein Hilfsenzym der β -Oxidation, ist in einigen Mamma-Karzinomen vermindert nachweisbar (Ursini-Siegel *et al.* 2007). Auch bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Versuchen geht eine verstärkte CD133-Expression mit dem verminderten Nachweis von DECR1 einher und stützt somit die These sowohl einer erleichterten Tumorentwicklung als auch -progression. DUSP5, ein Tumorsuppressor, inhibiert den ERK1/2 MAPK-Signalweg. Beim Magenkarzinom trägt die Hypermethylierung des DUSP5 Promotors, was die Expression stark vermindert, zur Karzinogenese bei (Shin *et al.* 2013). Auch bei den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen, geht eine Erhöhung von CD133 mit einer Heraufregulation von DUSP5 einher und trägt somit zur Karzinogenese bei. FERMT1 ist an der Integrin Aktivierung beteiligt (Lai-Cheong *et al.* 2009) und spielt eine Rolle in der

Proliferation, Polarität und Migration von epidermalen Keratinozyten (Herz *et al.* 2006). Durch eine verstärkte Expression von FERMT1 unter Erhöhung der CD133-Expression, können CD133⁺ Tumorzellen also schneller proliferieren und migrieren, d.h. auch zur Metastasierung beitragen. Die Transkription von RBP7, das für ein zelluläres Retinol-bindendes Protein kodiert, ist in Neuroblastom-Zellen erhöht (Caren *et al.* 2007). Auch bei CD133-exprimierenden Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Expression des Gens RBP7 festgestellt werden. RUNX3, ein Tumorsuppressorgen, das in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird, nimmt Einfluss auf den Wnt-Signalweg (Ju *et al.* 2014). Da bei erhöhter CD133-Expression bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit RUNX3 vermindert nachgewiesen werden kann, spricht eine Unterdrückung des Tumorsuppressors für eine erleichterte Karzinogenese. Für SHISA2 wurde ebenfalls berichtet, dass es den Wnt/ β -Catenin Signalweg moduliert und den Reifungsprozess von Zellen beeinflusst (Hedge and Mason 2008). Es kann also davon ausgegangen werden, dass Wachstum, Überleben sowie Invasion der CD133⁺ Zellen durch eine verminderte Expression von SHISA2 und folglich einer Verstärkung des Wnt-Signalwegs erleichtert werden.

Da beide Subpopulationen der HEK293 CD133^{-/+} angereichert mit dem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden waren und alle anderen Genveränderungen unter Umständen dadurch beeinflusst werden, sollten weitere Zelllinien mittels RT-PCR untersucht werden. In der konventionellen RT-PCR zeigte sich bei den HEK293 mit einem CD133-Expressionsplasmid bzw. einem Leerplasmid transfiziert, kaum eine Übereinstimmung mit den Microarray-Ergebnissen oder der RT-PCR der HEK293 CD133^{-/+} angereichert. Gut zu erkennen sind der Transfektionserfolg für CD133 und der fehlende Nachweis für CD133 bei den Leerplasmid transfizierten Zellen. Die restlichen Gene zeigten jedoch eine Veränderung der Regulation in die entgegengesetzte Richtung oder aber nur eine geringe Tendenz einer Übereinstimmung in der Höhe der Expressionsveränderung. Gleiches kann für HeLa Zellen, die ebenfalls mit einem CD133-Expressionsplasmid bzw. mit einem Leerplasmid transfiziert wurden, berichtet werden. Diese Beobachtung könnte dadurch zustande kommen, dass die Höhe der CD133-Expression zwischen den HEK293 CD133^{-/+} angereichert und den HEK293 sowie HeLa-Zellen, die mit dem CD133-Expressionsplasmid bzw. einem Leerplasmid transfiziert wurden, stark differiert und dadurch folglich auch

die eventuell davon abhängigen Genregulationen verändert sind. Bei der HEK293⁺ angereicherten Zellpopulation konnte eine relative Expression von CD133 auf das Doppelte im Vergleich zu den HEK293 CD133⁻ angereicherten Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu betrug der Unterschied in der relativen Expression von CD133 bei den mit einem CD133-Expressionsplasmid transfizierten Zellen ein Tausendfaches verglichen mit der Leerplasmid-transfizierten Zellpopulation. Zum zweiten könnte die CD133-Funktion in verschiedenen Zelllinien differieren, d.h. zu anderen Veränderungen im Transkriptom führen und dadurch der Unterschied in der Genregulation zu den HeLa-Zellen erklärt werden. Dann bleibt die Differenz der Genexpression in den beiden unterschiedlichen HEK293 Populationen jedoch noch immer unklar. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die zu wenig sensitive Methodenwahl der konventionellen RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese, da eine qRT-PCR deutlich validere Ergebnisse liefert.

Interessant ist auch der Vergleich der endogenen CD133-Expression in den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 mit dem experimentell hergestellten Zustand der CD133-Expression in der Zelllinie HEK293. Da CD133 wahrscheinlich eine natürliche Funktion in endogen CD133-positiven Zellen hat, waren eventuelle Gemeinsamkeiten in der Genregulation mit den Microarray-Ergebnissen und der RT-PCR der HEK293 CD133^{-/+} angereichert vorher unklar. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen waren die beiden Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 zu einer Hälfte mit einer CD133 siRNA doppelt transfiziert worden. Die andere Hälfte der Zellen erhielt nur eine Kontroll siRNA ohne Ziel-mRNA in der transfizierten Zelle und Unterdrückung der CD133-Expression. Bei beiden Zelllinien zeigte sich deutlich die erfolgreiche Transfektion mit der siRNA gegen CD133 durch Unterdrückung der Expression um ein Vielfaches. Bei der Zelllinie CaCo-2 konnte die relative Expression von CD133 auf 46% des Ausgangswertes reduziert werden, bei der Zelllinie MDA-MB468 gelang dies sogar auf 33% im Vergleich zu den Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Die Genregulation war teilweise gegensätzlich zu den Microarray-Daten bzw. nicht signifikant verändert: Sowohl bei den MDA-MB468 Zellen als auch bei den CaCo-2 Zellen konnte keine Übereinstimmung für die Regulation Gene BAI3 und SHISA2 im Vergleich mit dem Microarray festgestellt werden. Für DECR1 und GATA2 konnte bei beiden Zelllinien keine Signifikanz für eine veränderte Regulation nachge-

wiesen werden. Aber einige Gene wie CELF2, CNN2, RBP7 und RUNX3 zeigten bei CaCo-2 Expressionsunterschiede, die kongruent zu HEK293 CD133^{-/+} angereichert um ein Vielfaches verändert waren. Vor allem das Gen RBP7 zeigte von der Höhe des Regulationsunterschiedes bei beiden Zelllinien identische Werte. Bei den MDA-MB468 war die Übereinstimmung noch größer: Die Gene BACE2, CNN2, DUSP5, FERMT1, ZNF91 und ZNF420 waren signifikant gleichermaßen reguliert wie in HEK293 CD133^{-/+} angereichert, nur die Höhe der Regulationsveränderung war weniger stark ausgeprägt. Die differentiellen Genregulationen zu HEK293 CD133^{-/+} angereichert könnten dabei die gleichen Gründe haben, wie bereits oben für HEK293 Δ /CD133 transfiziert und HeLa Δ /CD133 transfiziert beschrieben. Einen weiteren Erklärungsversuch liefert die unzureichende Regulation von CD133 durch die verwendete siRNA bei den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468.

Anhand der Korrelation der Genregulation der Microarray-Ergebnisse bzw. RT-PCR für HEK293 CD133^{-/+} angereichert und den RT-PCR-Ergebnissen für MDA-MB468 csi/siRNA transfiziert, wurden übereinstimmende Gene nun folgend in der qRT-PCR für beide Zelllinien genauer untersucht. Dies sollte noch validere Daten der Genexpression liefern. Außerdem ist somit die Wirkung von CD133 in Zellen, die im Wildtyp kein CD133 exprimieren (HEK293) und mit einem CD133-Expressionsplamid transfiziert sind, mit Zellen die im Wildtyp endogen für CD133 codieren (MDA-MB468) und mit einer siRNA gegen CD133 transfiziert sind, vergleichend möglich. Alle beleuchteten Gene zeigten bei HEK293 CD133^{-/+} angereichert eine Übereinstimmung in der Richtung der Regulation, wobei vor allem für die CD133-Expression ein viel größerer Unterschied in der Expression im Vergleich zu den RT-PCR Ergebnissen zu verzeichnen war. Auch bei MDA-MB468 waren alle betrachteten Gene gleichermaßen reguliert, die Höhe des Expressionsunterschieds jedoch nicht so stark ausgeprägt. Dies könnte auf ähnliche Funktionen von CD133 in zwei stark unterschiedlichen Zelllinien, einerseits humane Mamma-Karzinom Zellen andererseits humane embryonale Nierenzellen, hindeuten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Veränderungen der CD133-Expression in verschiedenen Zelllinien die Gene nicht immer gleichermaßen reguliert sind, da wahrscheinlich noch einige weitere Einflussfaktoren existieren.

Zum einen sind die Zelllinien selbst durch verschiedene Eigenschaften charakterisiert. Zum anderen hat CD133 möglicherweise unterschiedliche Funktionen in den Zellen. Außerdem macht die Wahl der Untersuchungsmethode einen Unterschied bei der Detektion der Genexpression. Um genauere Aussagen machen zu können, sollte hier in jedem Fall die sensitivere qRT-PCR angewendet werden. Es kann jedoch festgestellt werden, dass CD133, egal ob endogen von einer Zelllinie exprimiert oder durch Transfektion mit einem Plasmid exprimiert, wahrscheinlich Einfluss auf die Regulation einiger Gene wie BACE2, BAI3, CNN2, DUSP5, FERMT1, GATA2, ZNF91 und ZNF420, nimmt. Diese Gene sollten im Fokus zukünftiger Untersuchungen stehen und genauer durchleuchtet werden.

5.3 Die Auswirkung von Zellstress auf die verschiedenen Zelllinien

Nachfolgend sollte betrachtet werden, ob CD133 durch Zellstress wie Hypoxie oder Nährstoffentzug Auswirkungen erfährt. Da dies essentielle Ereignisse sind, denen Tumorzellen im Laufe des Wachstums so gut wie immer ausgesetzt sind, ist die Betrachtung des Verhaltens von CD133 als Tumorstammzellmarker dabei informativ.

5.3.1 Die Auswirkung von Hypoxie auf Proliferation, Morphologie und CD133-Expression

Des Öfteren konnte bereits gezeigt werden, dass die CD133-Expression in TICs durch Hypoxie, wie sie meist innerhalb eines wachsenden Tumors auftritt, reversibel verstärkt wird (Griguer *et al.* 2008). Dabei werden die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen erweitert (Wu *et al.* 2014a). Die erhöhte Expression von CD133 unter Hypoxie ist Folge einer Heraufregulation von HIF-1 α und HIF-2 α (Sun *et al.* 2012, Ohnishi *et al.* 2013) und führt zu einer gesteigerten Aggressivität des Tumors (Hashimoto *et al.* 2011). Die folgende Abbildung 5.1 zeigt schematisch den Mechanismus des HIF-Signalwegs.

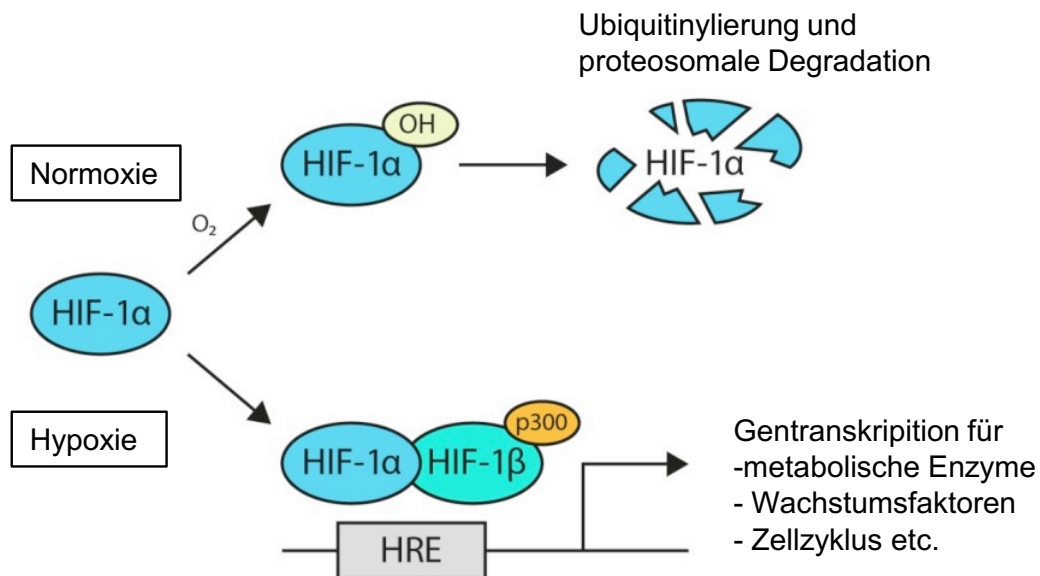


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des HIF-Signalwegs. Unter Normoxie wird HIF-1 α durch eine Prolinhydroxylase hydroxyliert. Hydroxyliertes HIF-1 α wird erkannt und über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg degradiert. Unter Hypoxie dimerisieren HIF-1 α und HIF-1 β und translokieren in den Nukleus, wo sie mit HRE (hypoxia response element) interagieren sowie den Transkriptions-Koaktivator p300 rekrutieren. Sodann wird die vollständige Transkription aller *downstream* Zielgene von HIF aktiviert, die das Zellüberleben, Motilität, Metabolismus und Angiogenese regulieren (Irollo and Pirozzi 2013).

Außerdem wird der Glykosylierungsstatus von CD133 durch hypoxische Bedingungen verstärkt. Je nachdem, ob ein geeigneter Antikörper verwendet wird, bleibt die Detektion von CD133 durch Maskierung des AC133-Epitops unter Umständen erfolglos. Möglicherweise ist das glykosylierte CD133 am Zellüberleben während der Hypoxie vermittelten Apoptose beteiligt (Lehnus *et al.* 2013). Es wurde beschrieben, dass auch die Proliferation und das Wachstum von CD133⁺ humanen TICs unter Hypoxie gesteigert sind. Die durch Hypoxie vermittelte Erhöhung von CD133 führt dabei zu einem Überleben der Zelle durch Anpassung an das neue Mikromilieu (Chettimada *et al.* 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien, auch CD133⁻ Zellen wie HEK293 und HeLa, unter Hypoxie morphologisch *in vitro* eine gedrängtere Form annehmen und mehr in Kolonien wachsen als breit am Boden des Kulturgefäßes verteilt. Auch die Proliferation unter Hypoxie *in vitro* ist im Vergleich zu normoxischen Bedingungen vermindert. Durchflusszytometrisch zeigte sich ein Rückgang der CD133-Expression bei 0,1% O_2

in den Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468. Da jedoch auch MHCI als ubiquitär vorkommendes Oberflächenprotein durch Hypoxie vermittelt einen Rückgang verzeichnete, ist die verminderte Expression von CD133 nicht sicher verwertbar. Da eventuell ein zu starker Sauerstoffentzug gewählt worden war, könnte es sein, dass die Zellen ihren Stoffwechsel auf ein Minimum zurückgefahren haben und deshalb nicht, wie von anderen Autoren beschrieben, die Proliferation durch Hypoxie vermittelten CD133 Anstieg gesteigert war. Zukünftig sollte dieser Versuch möglicherweise mit einem Sauerstoffgehalt von 1-3% durchgeführt werden (Hashimoto *et al.* 2011, Lehnus *et al.* 2013).

Interessant war vor allem der Vergleich der CD133-Regulation auf RNA-Ebene anhand von qRT-PCR Ergebnissen. Bei CaCo-2 zeigte sich ein Anstieg der CD133-Expression unter Hypoxie auf RNA-Ebene. Bei den ausgewählten untersuchten Genen, die möglicherweise durch CD133 reguliert sind, zeigte sich kongruent zu den Microarray-Ergebnissen der HEK293 CD133^{-/+} angereicherten Zellen ein Anstieg von BACE2 und GATA2. Bei der Zelllinie MDA-MB468 konnte eine leichte Heraufregulation von CD133 auf mRNA-Niveau festgestellt werden, die jedoch nicht so signifikant war wie bei CaCo-2. Auch BAI3 und GATA2 zeigten eine entsprechende Regulation, die aber ebenfalls nur sehr gering ausgeprägt war.

Dass CD133 auf Proteinebene herunterreguliert, auf mRNA-Ebene unter Hypoxie jedoch gestiegen war, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist eine fehlerhafte oder veränderte Translation der CD133 mRNA möglich, die dazu führt, dass das fertige Protein die Zelloberfläche nicht erreicht. Zum anderen kann durchflusszytometrisch die Detektion von CD133 durch Maskierung des AC133-Epitops durch Glykosylierung unter Hypoxie verringert sein (Lehnus *et al.* 2013). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das synthetisierte Protein durch unbekannte mittels Hypoxie aktivierte Mechanismen intrazellulär verbleibt, nicht in die Zellmembran eingebaut wird und somit der Detektion in der Durchflusszytometrie an nicht permeabilisierten Zellen entgeht. Auch eine fehlende Translation nach erfolgter Transkription bei einer Regulation der Genexpression durch miRNAs ist zu bedenken (Singh *et al.* 2011, Stroynowska-Czerwinska *et al.* 2014). Wenn miRNAs jedoch eine Degradation der mRNA verursachen, ist auch keine mRNA in der qRT-PCR messbar. Bei alleiniger

Translationshemmung durch miRNAs bleibt die mRNA aber detektierbar. Die Hemmung der Translation der mRNA wird entweder erreicht durch eine Spaltung mittels Endonukleasen, eine Repression der Translation oder durch ein beschleunigtes *decapping* der mRNA (Valencia-Sanchez *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009, Yu *et al.* 2015). Dies würde zu einem geringeren Nachweis des CD133 Proteins bei weiterhin bestehender Synthese von CD133 mRNA führen und erscheint somit als wahrscheinlichster Lösungsansatz für die vorliegenden Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Hypoxie eine wichtige Einflussgröße in der Mikroumwelt des Tumors darstellt und somit auch das Verhalten von Zellen in Bezug auf die CD133-Expression und möglicherweise durch CD133 regulierte Gene genauer erforscht werden sollte. Dies sollte bei zukünftigen Versuchen unter geeigneten Sauerstoffwerten und unter Einbeziehung der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert stattfinden.

5.3.2 Die Auswirkung von Nährstoffentzug auf Proliferation, Morphologie und CD133-Expression

Auch durch den Entzug von Nährstoffen *in vitro*, d.h. einer Reduktion von normalerweise 10% FCS im Medium auf 1% FCS, können die Zellen unter Stress gesetzt werden und reale Gegebenheiten in der Mikroumgebung eines Tumors simuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die beiden untersuchten Zelllinien CaCo-2 und MDA-MB468 morphologisch ähnliche Eigenschaften wie unter Hypoxie. Die Zellen nehmen *in vitro* eine eher gedrängte Form an und wachsen eng aneinander gedrängt in kleinen Kolonien. Die Proliferation war bereits nach 3 Tagen restriktiver als unter normalen Nährstoffbedingungen. Diese Auffälligkeit nahm nach 5 Tagen noch weiter deutlich zu. Durchflusszytometrisch konnte ebenfalls ein Rückgang der CD133-Expression auf Oberflächenprotein-Ebene gezeigt werden, der nach 5 Tagen noch stärker war als nach 3 Tagen. In Zukunft sollten für Experimente, bei denen die Auswirkungen nach Nährstoffentzug genauer betrachtet werden, eventuell auch Untersuchungen mit einem geringeren Nährstoffentzug, bspw. mit 3-5% FCS, durchgeführt werden.

Insgesamt zeigten sich unter Nährstoffentzug bezogen auf Morphologie, Proliferation und CD133 Protein-Expression annähernd identische Ergebnisse wie im vorangegangenen Experiment unter hypoxischen Bedingungen beschrieben. Die verschiedenen Erklärungsansätze für die Regulation der CD133-Expression decken sich somit ebenfalls mit den in 5.3.1 aufgezeigten.

5.4 Veränderung der CD133-Expression durch Einleitung der EMT

Wie anhand von HNO-Tumorzellen nachgewiesen, wird die EMT über den Src-Signalweg, eine Herunterregulation von E-Cadherin sowie Expression von Vimentin eingeleitet und geht mit einer Erhöhung der CD133-Expression einher. Dies führt sowohl zu einer gesteigerten Invasionsfähigkeit und einem verbesserten Migrationsvermögen als auch zu einer erhöhten Aggressivität der Tumorzellen (Mandal *et al.* 2008, Chen *et al.* 2011, Ding *et al.* 2014). Mittels Kolonkarzinomzellen konnte jedoch keine funktionelle Relevanz der CD133-Expression im Hinblick auf die Malignität und Metastasierungsfähigkeit der Zellen gezeigt werden (Horst *et al.* 2009b). Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung von Voon *et al.* sein: Ein Verlust der RUNX3 Funktion, wie es die Ergebnisse des vorliegenden Microarrays bei erhöhter CD133-Expression zeigen, resultierte dabei in einer spontanen EMT in gastralen Epithelzellen (Voon *et al.* 2012).

In dieser Arbeit wurde die EMT mittels TGF β in CaCo-2 Zellen, die eine endogene Expression von CD133 aufweisen, eingeleitet. Die Proliferation zeigte sich nach 48 Stunden bei den behandelten Zellen vermindert, nach 72 Stunden jedoch erhöht. Morphologisch konnte keine eindeutige Veränderung festgestellt werden. Die mesenchymal veränderte Morphologie der Zellen war bei der Kontrollzelllinie A549 schon nach 48 Stunden sichtbar. Durchflusszytometrisch wurde eine leicht verringerte CD133-Expression detektiert, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Mittels qRT-PCR zeigte sich die Menge der CD133 mRNA nach 48 Stunden fast unverändert, nach 72 Stunden geringfügig erhöht. Die untersuchten mesenchymalen Marker stiegen zwar bei CaCo-2 durch die Zugabe von TGF β um 40 bzw. 61%, jedoch nicht um ein Vielfaches, wie anhand der Kontrollzelllinie A549 gezeigt werden konnte. Bei den A549 Zellen ver-

zeichneten die mesenchymalen Marker einen Anstieg um das 4- bzw. sogar 8-fache.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die EMT bei der Zelllinie CaCo-2 *in vitro* nicht ausreichend induziert werden konnte, was eventuell auch an der Wahl der Zelllinie liegen könnte (Horst *et al.* 2009b). Denn nicht mit jeglicher Zellpopulation lässt sich die EMT erfolgreich einleiten. Dies könnte daran liegen, dass vermutlich nicht jede Zelllinie TGF β -Rezeptoren exprimiert. Ein Fehler im Ablauf des Experiments lässt sich insofern ausschließen als bei der Kontrollzelllinie A549 die EMT erfolgreich gezeigt werden konnte und auch das TGF β somit funktionsfähig zu sein schien. Da, wie von manchen Autoren gegenteilig beschrieben, die CD133-Expression durch versuchte Induktion der EMT im Vergleich zum Ausgangswert nicht erhöht war, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Faktoren sowie unbekannte Umstände für die Induktion der EMT einen Einfluss haben. Deshalb wurden auch keine weiteren Versuche hinsichtlich einer eventuellen Genregulation durchgeführt. Zukünftig sollte dieses Experiment mit einer anderen Zelllinie, bspw. mit der endogen CD133-exprimierenden Zelllinie MDA-MB468 wiederholt werden.

5.5 Verankerungsunabhängiges Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien *in vitro*

Mittels eines Colony Formation Assay kann das verankerungsunabhängige Wachstum von Zellen *in vitro* nachgestellt werden. Es wurde beschrieben, dass CD133⁻ Glioblastom-Zellen zwar Stammzeleigenschaften erfüllen, aber nur CD133⁺ Tumorzellen zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum fähig sind (Beier *et al.* 2007). Die CD133⁺ Zellen sind dabei nicht nur mit einer erhöhten Bildung von Kolonien in Verbindung gebracht worden, sondern auch mit verstärkter Motilität und vermehrtem Widerstand gegenüber Apoptose (Elsaba *et al.* 2010). Ebenfalls gezeigt wurde eine Expression von GATA2 bei hämatopoetischen Kolonien bildenden Zellen (Kaufman *et al.* 2001). Bemerkenswert ist dies aufgrund der Heraufregulation des Transkriptionsfaktors GATA2 bei verstärkter CD133-Expression, wie in den Microarray-Ergebnissen von HEK293 CD133^{-/+} angereichert gezeigt werden konnte. Auf der anderen Seite behaupteten Shmelkov *et al.* jedoch, dass sowohl CD133⁻ als auch CD133⁺ metastatische

Kolon-Karzinomzellen *in vitro* Kolonien bilden können und *in vivo* tumorigen sind (Shmelkov *et al.* 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnten oben beschriebene Ergebnisse bestätigt werden. Bei der Zelllinie HEK293 CD133⁺ angereichert zeigte sich eine signifikant höhere Bildung von Kolonien als bei HEK293 CD133⁻ angereichert. Dieser Effekt war bei der Wahl einer geeigneten Zellzahl zu Beginn des Experiments am eindeutigsten erkennbar. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die HEK293 CD133⁺ Zellen ein aggressiveres Wachstum zeigen und damit *in vivo* in einem Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen. Anhand der gleichen Zelllinie konnte bereits *in vivo* mittels immunodefizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass HEK293 CD133⁺ angereichert eine höhere Tumorigenität und Tumor initiiierende Eigenschaften besitzen als HEK293 CD133⁻ angereichert (Canis *et al.* 2013).

Mit den endogen CD133-positiven Mamma-Karzinomzellen MDA-MB468 wurde das gleiche Experiment ebenfalls durchgeführt und es konnte eine ähnlich hohe Bildung von Kolonien wie bei HEK293 CD133⁺ angereichert festgestellt werden. Leider gab es für diese Zellpopulation keine Referenz, da ein mehrmaliger Versuch der Transfektion mit einer shRNA gegen CD133 scheiterte. Dies sollte für zukünftige Experimente erneut mit einer weiteren shRNA versucht werden oder eventuell mittels einer anderen Transfektionsmethode wie der lentiviralen Transduktion. Des Weiteren wäre auch die Methode des CRISPR/Cas9-Systems für zukünftige Untersuchungen eine sinnvolle Alternative. Die für andere Experimente verwendete Subpopulation MDA-MB468, die zweifach mit einer CD133 siRNA transfiziert worden war, konnte in diesem Fall nicht verwendet werden. Da für einen 10 Tage dauernden Versuch die transiente Transfektion nicht suffizient genug ist, wären eventuelle Unterschiede der Ergebnisse in beiden Zellpopulationen nicht sicher verwertbar gewesen.

5.6 Gewebeinvasion durch HEK293 CD133^{-/+} Zellen *in vitro*

Durch ein Sphäroid-Modell kann *in vitro* die Invasionsfähigkeit von Zellen nachgestellt werden. Dieses Modell ahmt die Mikroumgebung humaner Tumoren

nach, da ein Gradient von Sauerstoff und Nährstoffen hergestellt wird mit aktiven, invasiven Zellen am Rand des Sphäroids und schlafenden oder sogar nekrotischen Zellen im Inneren des Zellverbunds (Naber *et al.* 2011). CD133⁺ primäre Gliom-Sphäroide zeigen *in vitro* Invasionsvermögen sowie Stammzeleigenschaften (Aaberg-Jessen *et al.* 2013) und außerdem eine höhere Kapazität für Chemoresistenz, Migration und Tumorigenität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Leng *et al.* 2013).

Anhand eines Fibroblasten-Sphäroids und eines HEK293 CD133⁻ bzw. CD133⁺ Sphäroids mit der geeigneten Zellzahl wurde in der vorliegenden Arbeit das Invasionsvermögen der HEK293 Zellen in den Fibroblastenzellverbund getestet. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie oben bereits von anderen Autoren beschrieben. Es zeigte sich morphologisch ein stark unterschiedliches Wachstumsverhalten der HEK293 Zellen. Die CD133⁺ Sphäroide wuchsen in einem lockeren Zellverband, der den Anschein machte, als wäre er im Begriff sich aufzulösen. Auch das entsprechende Fibroblasten-Sphäroid zeigte Anzeichen einer Auflösung, vor allem an den Randbereichen, und außerdem eine Invasion der HEK293 CD133⁺ Zellen zwischen die einzelnen Fibroblasten mit einer Auflösung der fibroblastischen Zell-Zell-Kontakte. Anders verhielt es sich bei einem HEK293 CD133⁻ Sphäroid im Zusammenhang mit einem Fibroblasten-Sphäroid. Die HEK293 CD133⁻ Zellen waren sehr dicht gedrängt, gaben die engen Zellkontakte nicht auf und umwuchsen die Fibroblasten langsam, lösten die fibroblastischen Zell-Zell-Kontakte jedoch nicht auf und zeigten auch keine Invasion zwischen die einzelnen Fibroblasten. Eine Kryokonservierung mit anschließender histologischer Aufarbeitung gelang aufgrund des geringen Zusammenhalts der Sphäroide, vor allem der HEK293 CD133⁺ angereicherten Zellen, leider nicht. Dies sollte Gegenstand zukünftiger Experimente sein, da dann vor allem die Verteilung der CD133-Expression durch Anfärbung in einem einzelnen Sphäroid genauer detektiert werden kann.

5.7 Ausblick

CD133, ein häufig untersuchter Tumorstammzellmarker, spielt eine wichtige Rolle in diversen Tumorentitäten. Obwohl bekannt ist, dass verstärkte CD133-Expression mit einer schlechteren Überlebensprognose für den Patienten und

einer erhöhten Therapieresistenz einhergehen, ist auf molekularer und biochemischer Ebene immer noch wenig über die Funktion und Signalwege von CD133 bekannt. Durch weitere Arbeiten mit CD133 und ein besseres Verständnis für das Molekül könnten in Zukunft spezifische, gegen CD133 gerichtete Krebs-Therapien entwickelt werden, die zusätzlich möglichst auch noch individuell auf den Patienten zugeschnitten sein werden.

Das Verhalten CD133-positiver Zellen *in vitro* ist seit längerem im Fokus der Forschung. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines Sphäroid-Modells das Invasionsvermögen vergleichend zwischen CD133⁻ und CD133⁺ angereicherten HEK293 Zellen dargestellt werden. Für das Tumorstadium *in vivo* ist dies eine essentielle Eigenschaft der Zellen. Hier zeigte sich, wie schon von Elsaba *et al.* beschrieben, eine größere Invasionskapazität der CD133-positiven Zellen (Elsaba *et al.* 2010). Sinnvoll für zukünftige Arbeiten wäre dabei auch die Untersuchung endogen CD133-positiver Zellen. Dafür sollten dann auch mit shRNA gegen CD133 transifizierte Zellen als Vergleichspopulation verwendet werden. Dies könnte bspw. durch eine lentivirale Transduktion der Zelllinie erfolgversprechend sein. Des Weiteren wäre auch die Methode des CRISPR/Cas9-Systems für zukünftige Untersuchungen eine sinnvolle Alternative. Außerdem sollte dann zusätzlich eine histologische Aufarbeitung der Sphäroide erfolgen, um die CD133-Expression genauer quantifizieren und lokalisieren zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass auch das verankerungsunabhängige Wachstum *in vitro* bei CD133-positiven Zellen im Vergleich zu CD133-negativen Zellpopulationen signifikant erhöht ist (Ricci-Vitiani *et al.* 2007). Dies stellt ebenfalls eine wichtige Eigenschaft aggressiver Tumorzellen *in vivo* dar. In dieser Arbeit konnte diese These mit Hilfe eines Colony Formation Assay erfolgreich überprüft werden. Reizvoll wäre in der Zukunft unter anderem auch die Betrachtung endogen CD133-positiver Zellen und einer gegen CD133 transfizierten Subpopulation.

In vivo Experimente sind für die genaue Charakterisierung der Zelleigenschaften unerlässlich. Anhand der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert konnte ein Unterschied durch die Höhe der CD133-Expression hinsichtlich Tumorigenität und Tumor initiiertem Potential bereits

festgestellt werden (Canis *et al.* 2013). Andere Autoren beschreiben hinsichtlich der CD133-Expression jedoch keinen Unterschied im Potential der Tumorentstehung (Chen *et al.* 2011). Aus diesem Grund sollten für zukünftige *in vivo* Arbeiten definitiv auch andere Zelllinien mit differierender CD133-Expression auf die Kapazität Tumoren zu bilden ausgetestet werden.

Auf molekularer Ebene sind bisher nur wenige Signalwege, in denen CD133 eine Rolle spielt, entdeckt worden. Unter anderem der Src-Signalweg (Chen *et al.* 2011) sowie der PI3K/Akt- und Bcl-2-Signalweg (Ma *et al.* 2008) scheinen regulativ in Zusammenhang mit CD133 zu stehen. Eine genauere Erforschung dieser oder weiterer Signalwege sollte in Zukunft in den Fokus der Forschung rücken.

Auch die EMT leistet einen signifikanten Beitrag an der Metastasierung und dem Verhalten maligner Tumoren. Dabei zeigt CD133 ebenfalls häufig eine erhöhte Expression (Ding *et al.* 2014). In dieser Arbeit konnte zwar kein Zusammenhang zwischen der EMT und CD133-Expression gefunden werden. Dieses oder ein ähnliches Experiment sollte jedoch mit einer weiteren Zelllinie, wie bspw. den endogen CD133-positiven MDA-MB468 Zellen, wiederholt werden.

Mittels eines Microarrays konnte die Genregulation ausgewählter Gene bei HEK293 CD133^{-/+} angereichert ausgewertet werden. Diese Ergebnisse konnten erfolgreich in der konventionellen RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese und auch in der qRT-PCR überprüft werden. Bei anderen Zelllinien wie HeLa, MDA-MB468 und CaCo-2 zeigte sich bei den meisten Genen jedoch keine oder nur eine geringe Regulation im Vergleich mit der Zelllinie HEK293 CD133^{-/+} angereichert. Die größten Übereinstimmungen fanden sich dabei noch für MDA-MB468 Zellen. Die Wiederholung einer Microarray-Untersuchung mit einer dieser Zelllinien würde zu valideren Ergebnissen und einer noch besseren Vergleichbarkeit mit den bereits vorliegenden Microarray-Daten für HEK293 CD133^{-/+} angereichert führen. Dann könnten eventuell in 2 Zelllinien durch verschiedene CD133-Expression identisch regulierte Gene noch tiefgreifender untersucht werden.

Die Wichtigkeit der Erforschung des Stammzellmarkers CD133 zeigt sich einerseits anhand des häufigen Vorkommens dieses Markers in diversen Tumorentitäten und andererseits in der geringen physiologischen Funktion des Proteins, da bei Ausfall des Gens durch Mutation *in vivo* außer einer Degeneration der

Photorezeptoren im Auge, die zum Krankheitsbild der *Retinitis pigmentosa* führt, keine weiteren Pathologien auftreten (Zacchigna *et al.* 2009). Aus diesen Gründen scheint CD133 für eine spezifische anti-tumoröse Therapie äußerst geeignet zu sein.

6 Zusammenfassung

Das Tumor-assoziierte Antigen CD133 wurde erstmals 1997 im Zusammenhang mit CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beschrieben (Miraglia *et al.* 1997). Später wurde beschrieben, dass das Glykoprotein CD133 auch an der Oberfläche von Zellen diverser Tumorentitäten exprimiert wird. Dies wurde in letzten Jahren genutzt, um TICs (*tumor initiating cells*) zu isolieren und anschließend näher zu charakterisieren (Singh *et al.* 2003). Ein geringeres Gesamtüberleben für den Patienten bei starker CD133-Expression sowie eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wurden bereits mehrfach beschrieben (Bourguignon *et al.* 2014, Oliver *et al.* 2014, Wang *et al.* 2014). Da TICs als ursächlich für Tumorentstehung, Metastasierung und Rezidiv betrachtet werden, sind sie Gegenstand der Krebsforschung und von bedeutendem Interesse in der Medizin. Trotz aller Bemühungen ist über die Funktion und Signalwege von CD133 auf molekularer und biochemischer Ebene bis heute wenig bekannt. Da das übergeordnete Ziel die Entwicklung spezifischer gegen CD133 gerichteter Therapien ist, werden weiterhin große Anstrengungen in der Erforschung von CD133 unternommen.

Folgende Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit erzielt werden:

Mit der Durchführung eines Microarrays wurden potentielle Zielgene von CD133 identifiziert. Dies wurde durch Verwendung von HEK293 Zellen ermittelt, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert worden waren. In einem zweiten Schritt waren die Zellen durchflusszytometrisch nach hoher und niedriger CD133-Expression sortiert worden. In der vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche Sortierung nach CD133-Expressionslevel mittels qRT-PCR für diese Zelllinie bestätigt werden. Bei der Untersuchung weiterer Zelllinien wie HeLa, CaCo-2 oder MDA-MB468 zeigte sich jedoch häufig keine bzw. nur eine geringe Regulation, die mit den Microarray-Daten übereinstimmte. Die größte Korrelation der Genregulation mit HEK293 CD133^{-/+} angereichert zeigte sich für die Zelllinie MDA-MB468.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit das Verhalten der CD133-Expression unter Zellstress wie Hypoxie oder Nährstoffentzug *in vitro* gezeigt werden. Unter die-

sen Bedingungen sinkt die Expression von CD133 auf der Zelloberfläche, steigt jedoch auf mRNA-Niveau. Außerdem zeigen die Zellen eine eingeschränkte Proliferation und leicht veränderte Morphologie im Sinne einer verminderten, kugelförmigen Oberfläche sowie verminderter Adhärenz am Boden der Kulturschale. In der qRT-PCR mit Gesamt-RNA der Zelllinie CaCo-2 zeigten die Gene BACE2 und GATA2 eine zu CD133 entsprechende Regulation. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei in Zukunft auf GATA2 gelegt werden, da es bei allen untersuchten Zelllinien unter Hypoxie CD133-abhängig gleichermaßen reguliert war.

Die EMT konnte bei der Zelllinie CaCo-2 nicht erfolgreich eingeleitet werden und somit auch keine Aussagen über die CD133-Expression getroffen werden. Von anderen Autoren wurde jedoch bereits eine Heraufregulation von CD133 während der EMT anhand einer Pankreaskarzinom-Zelllinie beschrieben (Ding *et al.* 2014).

Das verankerungsunabhängige Wachstumsverhalten der HEK293 CD133^{-/+} angereicherten Zellen *in vitro* zeigte eine signifikant höhere Kolonien-Bildung bei der CD133-positiven Subpopulation sowie ein ebenfalls hohes Wachstum bei der endogen CD133-positiven Zelllinie MDA-MB468.

Mittels eines Sphäroid-Modells wurde das Invasionsvermögen von HEK293 CD133^{-/+} angereicherten Zellen betrachtet. Auch hier zeigte sich ein höheres invasives Potential, also aggressiveres Verhalten, in das Fibroblasten-Sphäroid bei den CD133-positiven Zellen im Vergleich zur CD133-negativen Subpopulation.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der verschiedenen Experimente in Einklang mit einer Heraufregulation von CD133 unter Zellstress, Tumorentstehung sowie -progression und Metastasierung stehen. Dies deckt sich mit der von verschiedenen Forschungsgruppen postulierten Relevanz der erhöhten Expression von CD133 in Bezug auf diverse Tumorentitäten. Eine durch CD133 hervorgerufene Genregulation und Veränderung zellulärer Signalwege sollte zum besseren Verständnis der Karzinogenese im Fokus künftiger Untersuchungen stehen, um detaillierte Einblicke in die Tumorgenese in Zusammenhang mit dem Tumormarker CD133 erhalten zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Aaberg-Jessen, C., Norregaard, A., Christensen, K., Pedersen, C.B., Andersen, C., Kristensen, B.W., 2013. Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. *Int J Clin Exp Pathol* 6 (4), 546-60.
- Aleman, L., De Sanjose, S., Tous, S., Quint, W., Vallejos, C., Shin, H.R., Bravo, L.E., Alonso, P., Lima, M.A., Guimera, N., Klaustermeier, J., Llombart-Bosch, A., Kasamatsu, E., Tatti, S.A., Felix, A., Molina, C., Velasco, J., Lloveras, B., Clavero, O., Lerma, E., Laco, J., Bravo, I.G., Guarch, R., Pelayo, A., Ordi, J., Andujar, M., Sanchez, G.I., Castellsague, X., Munoz, N., Bosch, F.X., Group, R.H.T.S., 2014. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007. *Int J Cancer* 135 (1), 88-95.
- Asahara, T., Kawamoto, A., 2004. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (3), C572-9.
- Baba, T., Convery, P.A., Matsumura, N., Whitaker, R.S., Kondoh, E., Perry, T., Huang, Z., Bentley, R.C., Mori, S., Fujii, S., Marks, J.R., Berchuck, A., Murphy, S.K., 2009. Epigenetic regulation of cd133 and tumorigenicity of cd133+ ovarian cancer cells. *Oncogene* 28 (2), 209-18.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., Mclendon, R.E., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 66 (16), 7843-8.
- Bauer, N., Fonseca, A.V., Florek, M., Freund, D., Jaszai, J., Bornhauser, M., Fargeas, C.A., Corbeil, D., 2008. New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (cd133). *Cells Tissues Organs* 188 (1-2), 127-38.
- Bauer, N., Wilsch-Brauninger, M., Karbanova, J., Fonseca, A.V., Strauss, D., Freund, D., Thiele, C., Huttner, W.B., Bornhauser, M., Corbeil, D., 2011. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/cd133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol Med* 3 (7), 398-409.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C.P., 2007. Cd133(+) and cd133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67 (9), 4010-5.
- Beier, D., Wischhusen, J., Dietmaier, W., Hau, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C.P., 2008. Cd133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 18 (3), 370-7.

- Bock, C., Kuhn, C., Ditsch, N., Krebold, R., Heublein, S., Mayr, D., Doisneau-Sixou, S., Jeschke, U., 2014. Strong correlation between n-cadherin and cd133 in breast cancer: Role of both markers in metastatic events. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Boivin, D., Labbe, D., Fontaine, N., Lamy, S., Beaulieu, E., Gingras, D., Beliveau, R., 2009. The stem cell marker cd133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by src and fyn tyrosine kinases. *Biochemistry* 48 (18), 3998-4007.
- Bolliger, M.F., Martinelli, D.C., Sudhof, T.C., 2011. The cell-adhesion g protein-coupled receptor bai3 is a high-affinity receptor for c1q-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (6), 2534-9.
- Bourguignon, L.Y., Shiina, M., Li, J.J., 2014. Hyaluronan-cd44 interaction promotes oncogenic signaling, microrna functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res* 123, 255-75.
- Bretz, N., Noske, A., Keller, S., Erbe-Hofmann, N., Schlange, T., Salnikov, A.V., Moldenhauer, G., Kristiansen, G., Altevogt, P., 2012. Cd24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (tfpi-2) in a c-src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis* 29 (1), 27-38.
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Buttiglieri, S., Deregibus, M.C., Cantino, D., Camussi, G., 2005. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 166 (2), 545-55.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., Gilbertson, R.J., 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11 (1), 69-82.
- Canis, M., Lechner, A., Mack, B., Zengel, P., Laubender, R.P., Koehler, U., Heissmeyer, V., Gires, O., 2012. Cd133 is a predictor of poor survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Biomark* 12 (2), 97-105.
- Canis, M., Lechner, A., Mack, B., Zengel, P., Laubender, R.P., Koehler, U., Heissmeyer, V., Gires, O., 2013. Cd133 induces tumour-initiating properties in hek293 cells. *Tumour Biol* 34 (1), 437-43.
- Caren, H., Fransson, S., Ejekkar, K., Kogner, P., Martinsson, T., 2007. Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. *Br J Cancer* 97 (10), 1416-24.
- Chen, C.Y., Zheng, D., Xia, Z., Shyu, A.B., 2009. Ago-tnrc6 triggers microrna-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16 (11), 1160-6.

- Chen, K., Li, Z., Jiang, P., Zhang, X., Zhang, Y., Jiang, Y., He, Y., Li, X., 2014. Co-expression of cd133, cd44v6 and human tissue factor is associated with metastasis and poor prognosis in pancreatic carcinoma. *Oncol Rep* 32 (2), 755-63.
- Chen, Y.S., Wu, M.J., Huang, C.Y., Lin, S.C., Chuang, T.H., Yu, C.C., Lo, J.F., 2011. Cd133/src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One* 6 (11), e28053.
- Chettimada, S., Joshi, S.R., Al Zoubi, A., Gebb, S.A., Mcmurtry, I.F., Gupte, R.S., Gupte, S.A., 2014. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a critical role in hypoxia-induced cd133+ progenitor cells self-renewal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Choi, D., Lee, H.W., Hur, K.Y., Kim, J.J., Park, G.S., Jang, S.H., Song, Y.S., Jang, K.S., Paik, S.S., 2009. Cancer stem cell markers cd133 and cd24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 15 (18), 2258-64.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J., 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65 (23), 10946-51.
- Corbeil, D., Fargeas, C.A., Huttner, W.B., 2001a. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 285 (4), 939-44.
- Corbeil, D., Joester, A., Fargeas, C.A., Jaszai, J., Garwood, J., Hellwig, A., Werner, H.B., Huttner, W.B., 2009. Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (cd133) in glial cells. *Glia* 57 (8), 860-74.
- Corbeil, D., Roper, K., Fargeas, C.A., Joester, A., Huttner, W.B., 2001b. Prominin: A story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2 (2), 82-91.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., Huttner, W.B., 2000. The human ac133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275 (8), 5512-20.
- Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., 1998. Ac133 hematopoietic stem cell antigen: Human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91 (7), 2625-6.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S., Bresolin, N., Comi, G.P., 2007. Isolation and characterization of murine neural

- stem/progenitor cells based on prominin-1 expression. *Exp Neurol* 205 (2), 547-62.
- Davies, M.A., Samuels, Y., 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29 (41), 5545-55.
- De Wynter, E.A., Buck, D., Hart, C., Heywood, R., Coutinho, L.H., Clayton, A., Rafferty, J.A., Burt, D., Guenechea, G., Bueren, J.A., Gagen, D., Fairbairn, L.J., Lord, B.I., Testa, N.G., 1998. Cd34+ac133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, nod/scid-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16 (6), 387-96.
- Ding, Q., Miyazaki, Y., Tsukasa, K., Matsubara, S., Yoshimitsu, M., Takao, S., 2014. Cd133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the erk pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer* 13, 15.
- Donovan, L.K., Potter, N.E., Warr, T., Pilkington, G.J., 2012. A prominin-1-rich pediatric glioblastoma: Biologic behavior is determined by oxygen tension-modulated cd133 expression but not accompanied by underlying molecular profiles. *Transl Oncol* 5 (3), 141-54.
- Dubreuil, V., Marzesco, A.M., Corbeil, D., Huttner, W.B., Wilsch-Brauninger, M., 2007. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* 176 (4), 483-95.
- Elsaba, T.M., Martinez-Pomares, L., Robins, A.R., Crook, S., Seth, R., Jackson, D., McCart, A., Silver, A.R., Tomlinson, I.P., Ilyas, M., 2010. The stem cell marker cd133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer. *PLoS One* 5 (5), e10714.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., De Maria, R., 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15 (3), 504-14.
- Ettinger, A.W., Wilsch-Brauninger, M., Marzesco, A.M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanova, J., Corbeil, D., Hyman, A.A., Huttner, W.B., 2011. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun* 2, 503.
- Fargeas, C.A., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2003a. Ac133 antigen, cd133, prominin-1, prominin-2, etc.: Prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells* 21 (4), 506-8.
- Fargeas, C.A., Florek, M., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2003b. Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 278 (10), 8586-96.

- Fargeas, C.A., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2007. Nomenclature of prominin-1 (cd133) splice variants - an update. *Tissue Antigens* 69 (6), 602-6.
- Fargeas, C.A., Joester, A., Missol-Kolka, E., Hellwig, A., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2004. Identification of novel prominin-1/cd133 splice variants with alternative c-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci* 117 (Pt 18), 4301-11.
- Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilieva, N., Leung, D., Choe, H., 2000. Bace2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (17), 9712-7.
- Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuso, S., Scambia, G., 2008. Expression of cd133-1 and cd133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 18 (3), 506-14.
- Florek, M., Haase, M., Marzesco, A.M., Freund, D., Ehninger, G., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2005. Prominin-1/cd133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 319 (1), 15-26.
- Furst, G., Schulte Am Esch, J., Poll, L.W., Hosch, S.B., Fritz, L.B., Klein, M., Godehardt, E., Krieg, A., Wecker, B., Stoldt, V., Stockschrader, M., Eisenberger, C.F., Modder, U., Knoefel, W.T., 2007. Portal vein embolization and autologous cd133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: Initial experience. *Radiology* 243 (1), 171-9.
- Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K., Fiedler, W., 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from ac133-positive progenitor cells. *Blood* 95 (10), 3106-12.
- Geissler, C., Hambek, M., Leinung, M., Diensthuber, M., Gassner, D., Stover, T., Wagenblast, J., 2012. The challenge of tumor heterogeneity--different phenotypes of cancer stem cells in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft mouse model. *In Vivo* 26 (4), 593-8.
- Gibbs, C.P., Kukekov, V.G., Reith, J.D., Tchigrinova, O., Suslov, O.N., Scott, E.W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., Steindler, D.A., 2005. Stem-like cells in bone sarcomas: Implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7 (11), 967-76.
- Gilbertson, R.J., Rich, J.N., 2007. Making a tumour's bed: Glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7 (10), 733-6.
- Gires, O., 2011. Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci* 68 (24), 4009-22.

- Gonzalez-Herrero, I., Romero-Camarero, I., Canueto, J., Cardenoso-Alvarez, E., Fernandez-Lopez, E., Perez-Losada, J., Sanchez-Garcia, I., Roman-Curto, C., 2013. Cd133+ cell content correlates with tumour growth in melanomas from skin with chronic sun-induced damage. *Br J Dermatol* 169 (4), 830-7.
- Gopisetty, G., Xu, J., Sampath, D., Colman, H., Puduvalli, V.K., 2013. Epigenetic regulation of cd133/prom1 expression in glioma stem cells by sp1/myc and promoter methylation. *Oncogene* 32 (26), 3119-29.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36 (1), 59-74.
- Griguer, C.E., Oliva, C.R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D.J., Lancaster, J.R., Jr., Gillespie, G.Y., 2008. Cd133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One* 3 (11), e3655.
- Grosse-Gehling, P., Fargeas, C.A., Dittfeld, C., Garbe, Y., Alison, M.R., Corbeil, D., Kunz-Schughart, L.A., 2013. Cd133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: Limitations, problems and challenges. *J Pathol* 229 (3), 355-78.
- Guo, R., Wu, Q., Liu, F., Wang, Y., 2011. Description of the cd133+ subpopulation of the human ovarian cancer cell line ovcar3. *Oncol Rep* 25 (1), 141-6.
- Gupta, P.B., Chaffer, C.L., Weinberg, R.A., 2009. Cancer stem cells: Mirage or reality? *Nat Med* 15 (9), 1010-2.
- Hamoud, N., Tran, V., Croteau, L.P., Kania, A., Cote, J.F., 2014. G-protein coupled receptor bai3 promotes myoblast fusion in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (10), 3745-50.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144 (5), 646-74.
- Handgretinger, R., Gordon, P.R., Leimig, T., Chen, X., Buhring, H.J., Niethammer, D., Kuci, S., 2003. Biology and plasticity of cd133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 996, 141-51.
- Hao, H.N., Zhao, J., Thomas, R.L., Parker, G.C., Lyman, W.D., 2003. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. *J Hematother Stem Cell Res* 12 (1), 23-32.
- Hashimoto, O., Shimizu, K., Semba, S., Chiba, S., Ku, Y., Yokozaki, H., Hori, Y., 2011. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of

- cd133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology* 78 (4), 181-92.
- Hay, E.D., 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154 (1), 8-20.
- Hedge, T.A., Mason, I., 2008. Expression of shisa2, a modulator of both wnt and fgf signaling, in the chick embryo. *Int J Dev Biol* 52 (1), 81-5.
- Heisey, R.E., Carroll, J.C., Warner, E., Mccready, D.R., Goel, V., 1999. Hereditary breast cancer. Identifying and managing brca1 and brca2 carriers. *Can Fam Physician* 45, 114-24.
- Hemmoranta, H., Satomaa, T., Blomqvist, M., Heiskanen, A., Aitio, O., Saarinen, J., Natunen, J., Partanen, J., Laine, J., Jaatinen, T., 2007. N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic n-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 35 (8), 1279-92.
- Herz, C., Aumailley, M., Schulte, C., Schlotzer-Schrehardt, U., Bruckner-Tuderman, L., Has, C., 2006. Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281 (47), 36082-90.
- Hess, D.A., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Hohm, S.A., Lahey, R., Eades, W.C., Creer, M.H., Nolta, J.A., 2006. Selection based on cd133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 107 (5), 2162-9.
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., Jung, A., 2008. Cd133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99 (8), 1285-9.
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., Jung, A., 2009a. Prognostic significance of the cancer stem cell markers cd133, cd44, and cd166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 27 (8), 844-50.
- Horst, D., Scheel, S.K., Liebmann, S., Neumann, J., Maatz, S., Kirchner, T., Jung, A., 2009b. The cancer stem cell marker cd133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol* 219 (4), 427-34.
- Hou, Y.C., Chao, Y.J., Tung, H.L., Wang, H.C., Shan, Y.S., 2014. Coexpression of cd44-positive/cd133-positive cancer stem cells and cd204-positive tumor-associated macrophages is a predictor of survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*.
- Iida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., Ueno, H., 2012. Hypoxia induces cd133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of oct3/4 and sox2. *Int J Oncol* 40 (1), 71-9.

- Irollo, E., Pirozzi, G., 2013. Cd133: To be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 5 (6), 563-81.
- Ishigami, S., Ueno, S., Arigami, T., Uchikado, Y., Setoyama, T., Arima, H., Kita, Y., Kurahara, H., Okumura, H., Matsumoto, M., Kijima, Y., Natsugoe, S., 2010. Prognostic impact of cd133 expression in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 30 (6), 2453-7.
- Jang, Y.K., Park, J.J., Lee, M.C., Yoon, B.H., Yang, Y.S., Yang, S.E., Kim, S.U., 2004. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 75 (4), 573-84.
- Janich, P., Corbeil, D., 2007. Gm1 and gm3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett* 581 (9), 1783-7.
- Jaszai, J., Janich, P., Farkas, L.M., Fargeas, C.A., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2007. Differential expression of prominin-1 (cd133) and prominin-2 in major cephalic exocrine glands of adult mice. *Histochem Cell Biol* 128 (5), 409-19.
- Jiang, B.H., Liu, L.Z., 2009. Pi3k/pten signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102, 19-65.
- Jiang, P., Du, W., Yang, X., 2013. P53 and regulation of tumor metabolism. *J Carcinog* 12, 21.
- Joyce, J.A., Pollard, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9 (4), 239-52.
- Ju, X., Ishikawa, T.O., Naka, K., Ito, K., Ito, Y., Oshima, M., 2014. Context-dependent activation of wnt signaling by tumor suppressor runx3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci* 105 (4), 418-24.
- Junttila, M.R., Evan, G.I., 2009. P53--a jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 9 (11), 821-9.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119 (6), 1420-8.
- Kania, G., Corbeil, D., Fuchs, J., Tarasov, K.V., Blyszczuk, P., Huttner, W.B., Boheler, K.R., Wobus, A.M., 2005. Somatic stem cell marker prominin-1/cd133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 23 (6), 791-804.
- Karbanova, J., Missol-Kolka, E., Fonseca, A.V., Lorra, C., Janich, P., Hollerova, H., Jaszai, J., Ehrmann, J., Kolar, Z., Liebers, C., Arl, S., Subrtova, D., Freund, D., Mokry, J., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2008. The stem cell marker cd133 (prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem* 56 (11), 977-93.

- Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., Thomson, J.A., 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (19), 10716-21.
- Kemper, K., Sprick, M.R., De Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., Medema, J.P., 2010a. The ac133 epitope, but not the cd133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 70 (2), 719-29.
- Kemper, K., Tol, M.J., Medema, J.P., 2010b. Mouse tissues express multiple splice variants of prominin-1. *PLoS One* 5 (8), e12325.
- Kemper, K., Versloot, M., Cameron, K., Colak, S., De Sousa E Melo, F., De Jong, J.H., Bleackley, J., Vermeulen, L., Versteeg, R., Koster, J., Medema, J.P., 2012. Mutations in the ras-raf axis underlie the prognostic value of cd133 in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 18 (11), 3132-41.
- Kim, K., Ro, J.Y., Kim, S., Cho, Y.M., 2012. Expression of stem-cell markers oct-4 and cd133: Important prognostic factors in papillary renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 43 (12), 2109-16.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (2), 159-70.
- Koehl, U., Zimmermann, S., Esser, R., Sorensen, J., Gruttner, H.P., Duchscherer, M., Seifried, E., Klingebiel, T., Schwabe, D., 2002. Autologous transplantation of cd133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia. *Bone Marrow Transplant* 29 (11), 927-30.
- Kusumbe, A.P., Mali, A.M., Bapat, S.A., 2009. Cd133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells* 27 (3), 498-508.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227 (5259), 680-5.
- Lai-Cheong, J.E., Parsons, M., Tanaka, A., Ussar, S., South, A.P., Gomathy, S., Mee, J.B., Barbaroux, J.B., Techanukul, T., Almaani, N., Clements, S.E., Hart, I.R., Mcgrath, J.A., 2009. Loss-of-function fermt1 mutations in kindler syndrome implicate a role for fermitin family homolog-1 in integrin activation. *Am J Pathol* 175 (4), 1431-41.
- Laks, D.R., Visnyei, K., Kornblum, H.I., 2010. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. *Yonsei Med J* 51 (5), 633-40.
- Lane, D.P., 1992. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 358 (6381), 15-6.
- Lang, P., Bader, P., Schumm, M., Feuchtinger, T., Einsele, H., Fuhrer, M., Weinstock, C., Handgretinger, R., Kuci, S., Martin, D., Niethammer, D.,

- Greil, J., 2004. Transplantation of a combination of cd133+ and cd34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 124 (1), 72-9.
- Lardon, J., Corbeil, D., Huttner, W.B., Ling, Z., Bouwens, L., 2008. Stem cell marker prominin-1/ac133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas. *Pancreas* 36 (1), e1-6.
- Lee, A., Kessler, J.D., Read, T.A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W.B., Johnson, J.E., Wechsler-Reya, R.J., 2005. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 8 (6), 723-9.
- Lehnus, K.S., Donovan, L.K., Huang, X., Zhao, N., Warr, T.J., Pilkington, G.J., An, Q., 2013. Cd133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells. *Int J Oncol* 42 (3), 1011-7.
- Leng, Z., Tao, K., Xia, Q., Tan, J., Yue, Z., Chen, J., Xi, H., Li, J., Zheng, H., 2013. Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PLoS One* 8 (2), e56082.
- Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Langer, R., 2002. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (7), 4391-6.
- Li, F., Zeng, H., Ying, K., 2011. The combination of stem cell markers cd133 and abcg2 predicts relapse in stage i non-small cell lung carcinomas. *Med Oncol* 28 (4), 1458-62.
- Li, M., Song, L., Qin, X., 2010. Glycan changes: Cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *J Biosci* 35 (4), 665-73.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., Mclendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15 (6), 501-13.
- Lu, C., Shervington, A., 2008. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 312 (1-2), 71-80.
- Ma, S., Lee, T.K., Zheng, B.J., Chan, K.W., Guan, X.Y., 2008. Cd133+ hcc cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the akt/pkb survival pathway. *Oncogene* 27 (12), 1749-58.
- Maeda, S., Shinchii, H., Kurahara, H., Mataka, Y., Maemura, K., Sato, M., Natsugoe, S., Aikou, T., Takao, S., 2008. Cd133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-c expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 98 (8), 1389-97.
- Mak, A.B., Blakely, K.M., Williams, R.A., Penttila, P.A., Shukalyuk, A.I., Osman, K.T., Kasimer, D., Ketela, T., Moffat, J., 2011. Cd133 protein n-

- glycosylation processing contributes to cell surface recognition of the primitive cell marker ac133 epitope. *J Biol Chem* 286 (47), 41046-56.
- Mak, A.B., Nixon, A.M., Kittanakom, S., Stewart, J.M., Chen, G.I., Curak, J., Gingras, A.C., Mazitschek, R., Neel, B.G., Stagljar, I., Moffat, J., 2012. Regulation of cd133 by hdac6 promotes beta-catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep* 2 (4), 951-63.
- Mandal, M., Myers, J.N., Lippman, S.M., Johnson, F.M., Williams, M.D., Rayala, S., Ohshiro, K., Rosenthal, D.I., Weber, R.S., Gallick, G.E., El-Naggar, A.K., 2008. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: Association of src activation with e-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* 112 (9), 2088-100.
- Marzesco, A.M., 2013. Prominin-1-containing membrane vesicles: Origins, formation, and utility. *Adv Exp Med Biol* 777, 41-54.
- Marzesco, A.M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (cd133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 118 (Pt 13), 2849-58.
- Marzesco, A.M., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Janich, P., Langenfeld, K., Thiele, C., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2009. Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Lett* 583 (5), 897-902.
- Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Tamura, T., Yamada, Y., Saijo, N., Nishio, K., 2009. Mtor signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate cd133 expression in cancer cells. *Cancer Res* 69 (18), 7160-4.
- Maw, M.A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson-Wheeler, J.C., Bridges, R.J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., Denton, M.J., 2000. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet* 9 (1), 27-34.
- Meng, E., Long, B., Sullivan, P., McClellan, S., Finan, M.A., Reed, E., Shevde, L., Rocconi, R.P., 2012. Cd44+/cd24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin Exp Metastasis* 29 (8), 939-48.
- Meregalli, M., Farini, A., Colleoni, F., Cassinelli, L., Torrente, Y., 2012. The role of stem cells in muscular dystrophies. *Curr Gene Ther* 12 (3), 192-205.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15 (2), 117-34.

- Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, P.P., Batra, S.K., 2007. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: Therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 11 (5), 981-1011.
- Min, K.J., So, K.A., Ouh, Y.T., Hong, J.H., Lee, J.K., 2012. The effects of DNA methylation and epigenetic factors on the expression of cd133 in ovarian cancers. *J Ovarian Res* 5 (1), 28.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90 (12), 5013-21.
- Missol-Kolka, E., Karbanova, J., Janich, P., Haase, M., Fargeas, C.A., Huttner, W.B., Corbeil, D., 2011. Prominin-1 (cd133) is not restricted to stem cells located in the basal compartment of murine and human prostate. *Prostate* 71 (3), 254-67.
- Mizrak, D., Brittan, M., Alison, M., 2008. Cd133: Molecule of the moment. *J Pathol* 214 (1), 3-9.
- Mok, K.Y., Jones, E.L., Hanney, M., Harold, D., Sims, R., Williams, J., Ballard, C., Hardy, J., 2014. Polymorphisms in bace2 may affect the age of onset alzheimer's dementia in down syndrome. *Neurobiol Aging* 35 (6), 1513 e1-5.
- Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., Gritti, A., Piccinini, A., Porro, D., Santinami, M., Invernici, G., Parati, E., Alessandri, G., La Porta, C.A., 2007. Melanoma contains cd133 and abcg2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer* 43 (5), 935-46.
- Naber, H.P., Wiercinska, E., Ten Dijke, P., Van Laar, T., 2011. Spheroid assay to measure tgf-beta-induced invasion. *J Vis Exp* (57).
- Nowell, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (4260), 23-8.
- O'brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E., 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445 (7123), 106-10.
- Ohnishi, S., Maehara, O., Nakagawa, K., Kameya, A., Otaki, K., Fujita, H., Higashi, R., Takagi, K., Asaka, M., Sakamoto, N., Kobayashi, M., Takeda, H., 2013. Hypoxia-inducible factors activate cd133 promoter through ets family transcription factors. *PLoS One* 8 (6), e66255.
- Olempska, M., Eisenach, P.A., Ammerpohl, O., Ungefroren, H., Fandrich, F., Kalthoff, H., 2007. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6 (1), 92-7.

- Oliver, J.A., Ortiz, R., Melguizo, C., Alvarez, P.J., Gomez-Millan, J., Prados, J., 2014. Prognostic impact of mgmt promoter methylation and mgmt and cd133 expression in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 14 (1), 511.
- Ong, C.W., Kim, L.G., Kong, H.H., Low, L.Y., Iacopetta, B., Soong, R., Salto-Tellez, M., 2010. Cd133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol* 23 (3), 450-7.
- Padovan, C.S., Jahn, K., Birnbaum, T., Reich, P., Sostak, P., Strupp, M., Straube, A., 2003. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and cd133+ stem-like cells. *Cell Transplant* 12 (8), 839-48.
- Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Montano, N., Mollinari, C., Biffoni, M., Cenci, T., Pierconti, F., Martini, M., De Maria, R., Larocca, L.M., 2011. Expression of the stem cell marker cd133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* 117 (1), 162-74.
- Parkin, D.M., 2011. 11. Cancers attributable to infection in the uk in 2010. *Br J Cancer* 105 Suppl 2, S49-56.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H., Friedman, G.D., 1994. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330 (18), 1267-71.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., Rafii, S., 2000. Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95 (3), 952-8.
- Pellacani, D., Packer, R.J., Frame, F.M., Oldridge, E.E., Berry, P.A., Labarthe, M.C., Stower, M.J., Simms, M.S., Collins, A.T., Maitland, N.J., 2011. Regulation of the stem cell marker cd133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol Cancer* 10, 94.
- Pfenninger, C.V., Roschupkina, T., Hertwig, F., Kottwitz, D., Englund, E., Bengzon, J., Jacobsen, S.E., Nuber, U.A., 2007. Cd133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* 67 (12), 5727-36.
- Piras, F., Perra, M.T., Murtas, D., Minerba, L., Floris, C., Maxia, C., Demurtas, P., Ugalde, J., Ribatti, D., Sirigu, P., 2010. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep* 23 (1), 17-24.
- Pirozzi, G., Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., La Rocca, A., Liguori, E., Martucci, N., Paino, F., Normanno, N., Rocco, G., 2011. Epithelial to mesenchymal transition by tgfbeta-1 induction increases stemness

- characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. PLoS One 6 (6), e21548.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., Morrison, S.J., 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456 (7222), 593-8.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (6859), 105-11.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., De Maria, R., 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445 (7123), 111-5.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J., Collins, A.T., 2004. Cd133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 117 (Pt 16), 3539-45.
- Roper, K., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2000. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2 (9), 582-592.
- Sagrinati, C., Netti, G.S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., Romagnani, P., 2006. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 17 (9), 2443-56.
- Salnikov, A.V., Gladkich, J., Moldenhauer, G., Volm, M., Mattern, J., Herr, I., 2010. Cd133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 126 (4), 950-8.
- Sartelet, H., Imbriglio, T., Nyalendo, C., Haddad, E., Annabi, B., Duval, M., Fetni, R., Victor, K., Alexendrov, L., Sinnett, D., Fabre, M., Vassal, G., 2012. Cd133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the akt pathway. *Histopathology* 60 (7), 1144-55.
- Schiapparelli, P., Enguita-German, M., Balbuena, J., Rey, J.A., Lazcoz, P., Castresana, J.S., 2010. Analysis of stemness gene expression and cd133 abnormal methylation in neuroblastoma cell lines. *Oncol Rep* 24 (5), 1355-62.
- Sgambato, A., Puglisi, M.A., Errico, F., Rafanelli, F., Boninsegna, A., Rettino, A., Genovese, G., Coco, C., Gasbarrini, A., Cittadini, A., 2010. Post-translational modulation of cd133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of ht29 human colon cancer cells: Implications for its detection. *J Cell Physiol* 224 (1), 234-41.

- Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L., Gearhart, J.D., 2001. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (1), 113-8.
- Shin, S.H., Park, S.Y., Kang, G.H., 2013. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter cpg island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 182 (4), 1275-85.
- Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., Chadburn, A., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., D'angelica, M., Kemeny, N., Lyden, D., Rafii, S., 2008. Cd133 expression is not restricted to stem cells, and both cd133+ and cd133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118 (6), 2111-20.
- Shmelkov, S.V., Jun, L., St Clair, R., McGarrigle, D., Derderian, C.A., Usenko, J.K., Costa, C., Zhang, F., Guo, X., Rafii, S., 2004. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein ac133. *Blood* 103 (6), 2055-61.
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21 (4), 575-81.
- Singh, S., Narang, A.S., Mahato, R.I., 2011. Subcellular fate and off-target effects of sirna, shrna, and mirna. *Pharm Res* 28 (12), 2996-3015.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., Dirks, P.B., 2004a. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23 (43), 7267-73.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63 (18), 5821-8.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004b. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432 (7015), 396-401.
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F., Park, D.M., 2009. Hypoxia promotes expansion of the cd133-positive glioma stem cells through activation of hif-1alpha. *Oncogene* 28 (45), 3949-59.
- Sompallae, R., Hofmann, O., Maher, C.A., Gedy, C., Behren, A., Vitezic, M., Daub, C.O., Devalle, S., Caballero, O.L., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Lawlor, E.R., Cebon, J., Hide, W., 2013. A comprehensive promoter landscape identifies a novel promoter for cd133 in restricted tissues, cancers, and stem cells. *Front Genet* 4, 209.

- Song, W., Li, H., Tao, K., Li, R., Song, Z., Zhao, Q., Zhang, F., Dou, K., 2008. Expression and clinical significance of the stem cell marker cd133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract* 62 (8), 1212-8.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M., Steinhoff, G., 2003. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361 (9351), 45-6.
- Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., Krzyzosiak, W.J., 2014. The panorama of mirna-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 71 (12), 2253-70.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., Moriwaki, H., 2006. Characterization of cd133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351 (4), 820-4.
- Sun, C., Song, H., Zhang, H., Hou, C., Zhai, T., Huang, L., Zhang, L., 2012. Cd133 expression in renal cell carcinoma (rcc) is correlated with nuclear hypoxia-inducing factor 1alpha (hif-1alpha). *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (10), 1619-24.
- Sun, Y., Kong, W., Falk, A., Hu, J., Zhou, L., Pollard, S., Smith, A., 2009. Cd133 (prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One* 4 (5), e5498.
- Tabu, K., Sasai, K., Kimura, T., Wang, L., Aoyanagi, E., Kohsaka, S., Tanino, M., Nishihara, H., Tanaka, S., 2008. Promoter hypomethylation regulates cd133 expression in human gliomas. *Cell Res* 18 (10), 1037-46.
- Taieb, N., Maresca, M., Guo, X.J., Garmy, N., Fantini, J., Yahi, N., 2009. The first extracellular domain of the tumour stem cell marker cd133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett* 278 (2), 164-73.
- Tang, J., Hu, G., Hanai, J., Yadlapalli, G., Lin, Y., Zhang, B., Galloway, J., Bahary, N., Sinha, S., Thisse, B., Thisse, C., Jin, J.P., Zon, L.I., Sukhatme, V.P., 2006. A critical role for calponin 2 in vascular development. *J Biol Chem* 281 (10), 6664-72.
- Terskikh, A.V., Bryant, P.J., Schwartz, P.H., 2006. Mammalian stem cells. *Pediatr Res* 59 (4 Pt 2), 13R-20R.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139 (5), 871-90.
- Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., Rocco, G., Pirozzi, G., 2009. The role of cd133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 36 (3), 446-53.

- Tirino, V., Desiderio, V., D'aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., Galderisi, U., Cavaliere, C., De Rosa, A., Papaccio, G., Giordano, A., 2008. Detection and characterization of cd133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One* 3 (10), e3469.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., Pirozzi, G., Papaccio, G., 2011. Human primary bone sarcomas contain cd133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J* 25 (6), 2022-30.
- Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., Stassi, G., 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1 (4), 389-402.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., Pellegrino, M.A., Furling, D., Mouly, V., Butler-Browne, G.S., Bottinelli, R., Cossu, G., Bresolin, N., 2004. Human circulating ac133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 114 (2), 182-95.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., Weissman, I.L., 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (26), 14720-5.
- Ursini-Siegel, J., Rajput, A.B., Lu, H., Sanguin-Gendreau, V., Zuo, D., Papavasiliou, V., Lavoie, C., Turpin, J., Cianflone, K., Huntsman, D.G., Muller, W.J., 2007. Elevated expression of *decr1* impairs *erbB2/neu*-induced mammary tumor development. *Mol Cell Biol* 27 (18), 6361-71.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R., 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20 (5), 515-24.
- Vander Griend, D.J., Karthaus, W.L., Dalrymple, S., Meeker, A., Demarzo, A.M., Isaacs, J.T., 2008. The role of cd133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res* 68 (23), 9703-11.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8 (10), 755-68.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810), 307-10.
- Voon, D.C., Wang, H., Koo, J.K., Nguyen, T.A., Hor, Y.T., Chu, Y.S., Ito, K., Fukamachi, H., Chan, S.L., Thiery, J.P., Ito, Y., 2012. Runx3 protects

- gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. *Stem Cells* 30 (10), 2088-99.
- Vousden, K.H., Prives, C., 2009. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 137 (3), 413-31.
- Vyas, K.A., Patel, H.V., Vyas, A.A., Schnaar, R.L., 2001. Segregation of gangliosides gm1 and gd3 on cell membranes, isolated membrane rafts, and defined supported lipid monolayers. *Biol Chem* 382 (2), 241-50.
- Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., Enger, P.O., 2008. Cd133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to cd133 positive cells. *Int J Cancer* 122 (4), 761-8.
- Wang, W., Chen, Y., Deng, J., Zhou, J., Zhou, Y., Wang, S., Zhou, J., 2014. The prognostic value of cd133 expression in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Tumour Biol*.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., Huttner, W.B., 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (23), 12425-30.
- Wu, C.P., Du, H.D., Gong, H.L., Li, D.W., Tao, L., Tian, J., Zhou, L., 2014a. Hypoxia promotes stem-like properties of laryngeal cancer cell lines by increasing the cd133+ stem cell fraction. *Int J Oncol* 44 (5), 1652-60.
- Wu, H., Qi, X.W., Yan, G.N., Zhang, Q.B., Xu, C., Bian, X.W., 2014b. Is cd133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9 (6), e100168.
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S.S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y., Takamura, H., Wang, X.W., Kaneko, S., 2013. Discrete nature of epcam+ and cd90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57 (4), 1484-97.
- Yan, M., Yang, X., Wang, L., Clark, D., Zuo, H., Ye, D., Chen, W., Zhang, P., 2013. Plasma membrane proteomics of tumor spheres identify cd166 as a novel marker for cancer stem-like cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 12 (11), 3271-84.
- Yang, Z., Chen, Y., Lillo, C., Chien, J., Yu, Z., Michaelides, M., Klein, M., Howes, K.A., Li, Y., Kaminoh, Y., Chen, H., Zhao, C., Chen, Y., Al-Sheikh, Y.T., Karan, G., Corbeil, D., Escher, P., Kamaya, S., Li, C., Johnson, S., Frederick, J.M., Zhao, Y., Wang, C., Cameron, D.J., Huttner, W.B., Schorderet, D.F., Munier, F.L., Moore, A.T., Birch, D.G., Baehr, W., Hunt, D.M., Williams, D.S., Zhang, K., 2008. Mutant prominin

- 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J Clin Invest* 118 (8), 2908-16.
- Yi, J.M., Tsai, H.C., Glockner, S.C., Lin, S., Ohm, J.E., Easwaran, H., James, C.D., Costello, J.F., Riggins, G., Eberhart, C.G., Lattera, J., Vescovi, A.L., Ahuja, N., Herman, J.G., Schuebel, K.E., Baylin, S.B., 2008. Abnormal DNA methylation of cd133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Res* 68 (19), 8094-103.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W., 1997. Ac133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 (12), 5002-12.
- Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S., Gu, J., 2007. Cd133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 120 (7), 1444-50.
- Yu, A., Saudemont, B., Bouteiller, N., Elvira-Matelot, E., Lepere, G., Parent, J.S., Morel, J.B., Cao, J., Elmayan, T., Vaucheret, H., 2015. Second-site mutagenesis of a hypomorphic argonaute1 allele identifies superkiller3 as an endogenous suppressor of transgene posttranscriptional gene silencing. *Plant Physiol* 169 (2), 1266-74.
- Yuan, T.L., Cantley, L.C., 2008. Pi3k pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene* 27 (41), 5497-510.
- Zacchigna, S., Oh, H., Wilsch-Brauninger, M., Missol-Kolka, E., Jaszai, J., Jansen, S., Tanimoto, N., Tonagel, F., Seeliger, M., Huttner, W.B., Corbeil, D., Dewerchin, M., Vinckier, S., Moons, L., Carmeliet, P., 2009. Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/cd133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 29 (7), 2297-308.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., Herold-Mende, C.C., 2008. Stem cell marker cd133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14 (1), 123-9.
- Zhang, C., Xu, Y., Zhao, J., Fan, L., Jiang, G., Li, R., Ling, Y., Wu, M., Wei, L., 2011. Elevated expression of the stem cell marker cd133 associated with line-1 demethylation in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18 (8), 2373-80.
- Zhang, Q., Zulfiqar, F., Xiao, X., Riazuddin, S.A., Ahmad, Z., Caruso, R., Macdonald, I., Sieving, P., Riazuddin, S., Hejtmancik, J.F., 2007. Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the prom1 gene. *Hum Genet* 122 (3-4), 293-9.

- Zhao, P., Lu, Y., Jiang, X., Li, X., 2011. Clinicopathological significance and prognostic value of cd133 expression in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Sci* 102 (5), 1107-11.
- Zhou, F., Cui, C., Ge, Y., Chen, H., Li, Q., Yang, Z., Wu, G., Sun, S., Chen, K., Gu, J., Jiang, J., Wei, Y., 2010. Alpha2,3-sialylation regulates the stability of stem cell marker cd133. *J Biochem* 148 (3), 273-80.
- Zhou, J., Wang, H., Cannon, V., Wolcott, K.M., Song, H., Yates, C., 2011. Side population rather than cd133(+) cells distinguishes enriched tumorigenicity in htert-immortalized primary prostate cancer cells. *Mol Cancer* 10, 112.

8 Danksagung

Zuallererst und ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Gires dafür danken, dass ich diese experimentelle Doktorarbeit in seinem Labor in der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Klinikum Großhadern durchführen durfte. Das Thema war für mich sowohl spannend als auch vielseitig und ließ mich sehr vieles dazulernen. Vielen Dank für die fachlichen Ratschläge, Gespräche und immerwährend neuen Ideen.

Dem gesamten Laborteam möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, das tolle Arbeitsklima, die zahlreichen Diskussionen und die Zusammenarbeit danken. Mein ganz besonderer Dank geht dabei an Sannia Sarrach, Matthias Hachmeister, Heidi Kremling, Carola Eggert, Gisela Kranz und den Rest der HNO Forschung für ihre geduldige Einarbeitung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Ratschläge. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht so gut gelungen.

Meinem Papa danke ich für die unentwegte Unterstützung während meines gesamten bisherigen Lebenswegs. Du bist der Beste!

Mein besonderer Dank geht an meinen Micha, der immer für mich da war und mich stets ausgehalten, unterstützt und motiviert hat. Danke!